

# **Epidemiologische Untersuchungen zu Vorkommen und Charakterisierung von TT-Virus-Genomen in materno-fetalen Kompartimenten**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae ( Dr. med. )

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der  
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Ronald Langner

geboren am 30.September 1975 in Meiningen

### **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. med. A. Stelzner**
- 2. Prof. Dr. med. H.-J. Seewald**
- 3. Prof. Dr. T. Mertens**

**Tag der öffentlichen Verteidigung:**

**11.04.2005**

Teile der in dieser Arbeit gezeigten Untersuchungen wurden am 15. Mai 2004 als Poster im Rahmen der 3rd European Conference on Viral Diseases der Universität Regensburg, vorgestellt und im Anschluß veröffentlicht.

## 1. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit entstand in Zusammenarbeit mit der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Friedrich-Schiller-Universität Jena und dem Institut für Virologie und antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Das TT-Virus, Transfusion-transmitted-Virus wurde erstmals 1997 in Japan aus dem Serum eines Patienten mit Posttransfusionshepatitis unklarer Genese von der Arbeitsgruppe von Nishizawa (Nishizawa et al. 1997) isoliert. Der Patient, dessen Initialen (T.T.) ebenfalls zur Namensklärung zitiert wird, zeigte klinisch erhöhte Alanin-Aminotransferase-Werte (ALAT). Sowohl der Nachweis von Hepatitis A-E Viren als auch von Hepatitis G-Virus war negativ. Nach der Methode von Lisitsyn et al. (1993) fand man in diesen Proben DNA-Sequenzen, die keine Ähnlichkeit mit den bisher bekannten Virussequenzen aufwiesen.

Die klinische und epidemiologische Relevanz einer Infektion mit TTV ist bislang noch nicht hinreichend geklärt. Man ordnete das neu entdeckte Virus zunächst der Gruppe der Circoviren (Takahashi et al. 1998) zu. Aufgrund deutlicher Unterschiede zwischen TT-Virus und den bekannten Circoviren schlug die Arbeitsgruppe von Mushahwar et al. (1999) jedoch die Zuordnung von TT-Virus zu einer neuen Virusfamilie, der *Circinoviridae* vor. TTV weist eine extreme Sequenzvariabilität auf, bis heute sind mindestens 16 Genotypen beschrieben. Es konnten ebenfalls gemischte Infektionen des TT-Virus verschiedener Genotypen innerhalb eines Individuums nachgewiesen werden. Die hohe Prävalenz in der Bevölkerung verschiedener Länder wird jedoch nicht allein durch die parenterale Übertragung verursacht. Sowohl eine fäkal-orale als auch eine vertikale Transmission sind möglich. Dabei schwankt die Durchseuchung weltweit zwischen 11% und 100%. Dies kann nicht zuletzt durch die unterschiedliche Spezifität und Sensitivität der Nachweismethoden und die unterschiedlichen Primerbindungsregionen bei den PCR-Reaktionen erklärt werden. Aufgrund hoher Sequenzdivergenzen innerhalb des TTV-Genoms und innerhalb der einzelnen Regionen sind nur wenige PCR-Verfahren in der Lage, die nötige Sensitivität des Nachweises zu erreichen. So kann von einer erheblich höheren Durchseuchung ausgegangen werden.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit epidemiologischen Studien zum TT-Virus (TTV), seiner Charakterisierung und der Bedeutung für die vertikale Transmission.

Zur Beantwortung der Fragestellung kam die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) bei 624 Patientenproben von 148 schwangeren Frauen und deren Neugeborenen zum Einsatz. Dafür wurden spezifische Primer verwendet, die sich an eine stabile, konservierte Region (UTR) binden und den Nachweis aller bisher bekannten 16 Virusgenotypen ermöglichen.

Die Entnahme der klinischen Proben fand ausschließlich unter der Geburt in der Klinik für Geburtshilfe der FSU Jena statt. Die erhaltenen Amplifikate der UTR-Region wurden sequenziert und charakterisiert.

Es konnte festgestellt werden, dass die Durchseuchung der Bevölkerung im mitteldeutschen Raum sehr hoch ist. In **75,17%** der untersuchten Patientenmaterialien konnte eine Infektion mit dem Virus nachgewiesen werden. Durch die Sequenzierung von **41** positiv getesteten Proben von Mutter und Kind konnte gezeigt werden, dass die bisher umstrittene vertikale Transmission eine effektive Rolle bei der Übertragung des Virus spielt. Von insgesamt **115** neonatalen Seren (NS), wurden **25** TTV-positiv getestet (**21,7%**). Weiterhin konnte anhand der Sequenzvergleiche gezeigt werden, dass es trotz höchster Konservierung der nicht-translatierten Region (UTR) des Virus zu deutlichen Variabilitäten im Vergleich zum Prototyp **TA278** (Genotyp 1a) kommt.

Es wurden ferner mehrfach Primer definiert und PCR-Protokolle modifiziert, um die komplette Genomsequenz des TT-Virus (~ 3.8 kb) aus dem TTV-positiven Patientenmaterial zu amplifizieren und die entsprechenden Sequenzdaten auszuwerten. Aus dem vorliegenden Material konnten jedoch keine „long-PCR“-Produkte erzielt werden.

## **2. Einleitung**

TT-Virus (TTV) ist ein neues nicht-umhülltes Virus mit einem zirkulären DNA-Genom negativer Polarität. Es wurde 1997 zum ersten Mal bei einem japanischen Patienten identifiziert, welcher aufgrund einer Post-Transfusionshepatitis unbekannter Ätiologie behandelt wurde.

TTV besitzt große Sequenzunterschiede, daher wird es derzeit in 16 Genotypen eingeteilt mit einer evolutionären Distanz von  $>0.30$ . Das TT-Virus ist über Blut und Blutprodukte übertragbar, die hohe Durchseuchung der allgemeinen Bevölkerung weltweit lässt sich damit jedoch nicht erklären.

In den letzten Jahren seit der Entdeckung wurde das Virus intensiv studiert, um die molekularen Verhältnisse darzustellen und um zu klären, ob es allein in der Lage ist, Lebererkrankungen zu verursachen. Bis heute offen und ungeklärt sind zum Beispiel die Immunantwort und die Humanpathogenität. In einer aktuellen Arbeit von Maggi et al. (2003) wird über einen möglichen Zusammenhang mit akuten respiratorischen Erkrankungen und einer potentiell respiratorischen Transmission berichtet.

### **2.1 Aufbau des TT-Virus**

Das TT-Virus konnte bisher nicht elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Die bekannten physikalisch-chemischen Eigenschaften konnten jedoch aus Untersuchungen von Virusproben, die aus Seren und Fäkalextrakten stammten, gewonnen werden. Zur Bestimmung der Partikelgröße wurden Polycarbonat-Filter mit sich verengenden Poren eingesetzt. Das Virus hat danach einen Durchmesser zwischen 30 und 40 nm (Mushahwar et al. 1999) und eine isopyknische Caesium-Chlorid Dichte von 1.31-1.35 g/ml, sowie eine Dichte von 1.26 g/ml in Zuckerlösung (Okamoto et al. 1998), (Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1.: Eigenschaften des TT-Virus. \* offener Leserahmen ORF**

<b>Eigenschaften</b>	
<b>Struktur des Virion</b>	
Gestalt	ähnlich den Parvoviren oder den Circoviren
Grösse ( nm )	30-50
Symmetrie	Ikosaeder
<b>Physikalisch-chemische Eigenschaften</b>	
CsCl-Dichte	1.31-1.35 g/ml
Stabilität	resistent gegenüber Lösungsmitteln, trockener Hitze und niedrigem pH-Wert
<b>Genom</b>	
Typ	einzelsträngige DNA
Grösse	~ 3.8 kb
Form	kovalent geschlossener Kreis
Polarität	negativ
ORF's *	ORF 1, ORF 2, ORF 3 und weitere kleine
Variabilität	hoch

TTV besitzt keine Lipid-Hülle (Okamoto et al. 1998), dies konnte durch eine Tween 80-Behandlung gezeigt werden, wobei es unverändert blieb. Versuche mit dem Ziel der Inaktivierung umhüllter Viren zeigten, dass trockene Hitze bei 65°C für 96 Stunden und die Detergenzienbehandlung nicht ausreichten, die TTV-Infektiosität zu verringern. Die Stabilität des Virus ist mit derjenigen der Parvoviren vergleichbar (Bendinelli et al. 2001).

Frühere Studien zeigten, dass Nukleinsäuren von TTV sensitiv gegenüber DNase 1, aber resistent gegenüber RNase A sind. Dies führte zu der Annahme, dass das virale Genom in Form einer einzelsträngigen, nichtpolarisierten DNA vorliegt (Okamoto et al. 1999). Die initiale Sequenzierung des japanischen Prototypisolates TA 278 (Genotyp 1a) führte zu dem falschen Schluss eines linear vorliegenden Genoms. Später konnte eine etwa 113 bp große GC-reiche Region, die die beiden Genomenden zu einem zirkulären, geschlossenen Molekül verband, gezeigt werden. Hybridisierungs- und Nuklease-Protektionsassays bestätigten, dass das Virion den Minusstrang umhüllt (Mushahwar et al. 1999).

Heute werden Vertebratenviren ohne externe Lipoproteinhülle und mit einzelsträngiger DNA entweder den Parvoviren oder den Circoviren (Bendinelli et al. 2001) zugeordnet, aber die genaue Taxonomie ist nach wie vor ungeklärt. Initial ging man von der Zugehörigkeit der TT-Viren zu den Parvoviren aus, jedoch ist das Genom (3850 nt) beträchtlich kürzer als das aller bekannten Vertreter und linear; außerdem bestehen keine Sequenzhomologien (Okamoto et al. 2001). Wahrscheinlich ist die Zuordnung der TT-Viren zur Gruppe der Circoviren (Takahashi et al. 1998). Diese Viren sind durch ein unsegmentiertes zirkuläres Genom, isometrische Kapside, die durch ein einzelnes Strukturprotein VP1 entstehen, gekennzeichnet, ebenso durch das Fehlen von Lipiden und Carboanhydraten (Bendinelli et al. 2001).

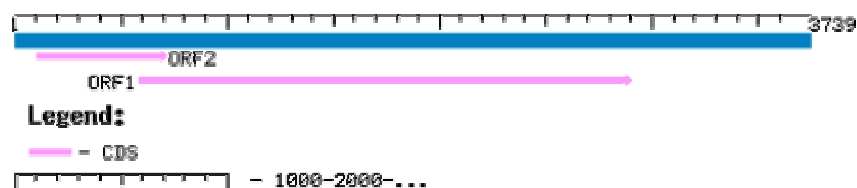
Erwähnt werden sollte, dass wegen der Unterschiede des TT-Virus zu den bekannten Circoviren die Arbeitsgruppe von Mushahwar et al. (1999) eine neue Virusfamilie für TTV vorschlug, die *Circinoviridae*. Weiterhin wurde kürzlich die Existenz eines neuen Virus berichtet, das TTV-like Minivirus, welches sich zwischen TT-Virus und Chicken Anemia Virus einordnet. Alle drei Viren sollten nach Takahashi et al. (2000) zur Gruppe der *Paracircoviridae* gerechnet werden. Zur Gruppe der Circoviren gehören auch animale Viren, wie das Porcine Circovirus, das Chicken Anemia Virus (Bassami et al. 1998) und das PM-Virus (Mushahwar et al. 1999). Animale Circoviren haben eine nur sehr begrenzte Sequenzhomologie untereinander und zum TT-Virus, antigene Determinanten dazu sind nicht bekannt. Das Genom des Chicken Anemia Virus ähnelt dem des TTV am meisten und besitzt ebenfalls drei teilweise überlappende offene Leseraster (ORF), die mit VP1, VP2 und VP3 bezeichnet sind. Diese kodieren für jeweils 52-, 24-, und 13 kDa große Proteine. Außerdem existieren noch weitere kleine ORF's (Kato et al. 1999).



## 2.2 Genomorganisation

Die bekannten TTV-Isolate variieren in der Länge zwischen 3808 nt (Stamm-SANBAN) und 3835 nt bei TA278 und JA20. Das Genom unterteilt sich in eine potentiell kodierende Region von ~2.6 kb und eine nicht-translatierte Region (UTR) von etwa 1.2 kb.

Die erst genannte Region besteht aus zwei großen, für Proteine kodierenden Genen, ORF1 und ORF2, die im Plusstrang komplementär zur Genom DNA liegen und teilweise überlappen (Prescott et al. 1999) (Abbild.2.1). Im Prototyp TA278 befindet sich ORF1 zwischen 589- und 2898 nt, ORF2 zwischen 107- und 712 nt, dies entspricht einer Kodierungskapazität von 770 und 150 Aminosäuren. Die Analyse von anderen Isolaten ergab einen weiteren, offenen Leserahmen (ORF3), der für ein 57 Aminosäuren großes Protein kodiert und downstream von ORF1 liegt.



**Abb. 2.1.: TTV-Genom.** Darstellung der Gene Offene Leserahmen 1 & 2 (ORF).

Eine GC-reiche Region, zwischen 3732 und 3853 nt liegend, komplettiert das zirkuläre Genom, sie besitzt einige stem-loop Strukturen, die unter den unterschiedlichen Isolaten erheblich variieren (Bendinelli et al. 2001). Wenn sich bestätigt, dass die Genomorganisation der des Chicken Anemia Virus ähnelt, könnte ORF1 das Äquivalent zum VP1 des CAV sein. Das Produkt des ORF1 besitzt einige Asparagin-verknüpfte Glykosylierungsstellen, die stark in der Zahl und in der Lokalisation unter den einzelnen Isolaten variieren. Solche Unterschiede bei den Glykosylierungsstellen könnten biologische Verhältnisse beim resultierenden Protein beeinflussen, wie die antigene Spezifität (Höhne et al. 1999). Ebenfalls auffällig ist, dass beide ORF-Produkte von TTV und CAV kurze Aminosäuren-Motive enthalten, die charakteristisch für die Replikation-assoziierten Proteine (REP) sind. Andere Circoviren besitzen ebenfalls solche Motive.

Von ORF2 wird angenommen, dass er für ein nichtstrukturiertes Protein codiert, welches in die virale Replikation involviert ist. Das Produkt ist etwa 150 Aminosäuren lang und variiert ebenfalls stark in unterschiedlichen Isolaten (Hijikata et al. 1999, Okamoto et al. 1999). Trotz der großen Genomheterogenität unter allen TT-Virus Isolaten gibt es ein Segment zwischen etwa 46-66 AS innerhalb des ORF2-Proteins, das 5 gut konservierte Positionen bei allen TTV-Isolaten und beim CAV besitzt (Kao et al. 1999), was für die Verwandtschaft der beiden Viren spricht. Die nichtkodierende untranslatierte Region (UTR) des TTV-Genoms enthält die bereits erwähnte GC-reiche Region und einige regulatorische Sequenzen. Das Segment besitzt außerdem multiple invertierte Wiederholungen, welche die Fähigkeit besitzen, stem-loop-Strukturen zu formen (Gallian et al. 2000). Eine solche findet sich downstream der Polyadenylationsstelle und kommt sehr konserviert in allen Sequenzen vor (auch im sehr heterogenen SANBAN-Isolat). Ähnliche Sekundärstrukturen finden sich bei CAV und anderen Circoviren, jedoch in unterschiedlichen Lokalisationen des Genoms. Diese Strukturen könnten eine Rolle bei der viralen Replikation spielen (Okamoto et al. 1999). Eine weitere Übereinstimmung zwischen der UTR von TTV und CAV ist das Vorhandensein eines 36 nt großen Bereichs, mit einer über 80 % Homologie.

### **2.3 Genetische Heterogenität**

Im Gegensatz zu den meisten DNA-Viren besitzt das TT-Virus eine extreme genetische Heterogenität. Beim Vergleichen der bekannten Sequenzen zeigte sich, dass die Unterschiede ungleich über das gesamte Genom verteilt sind. Die nicht-translatierende Region (UTR) ist vergleichsweise gut konserviert (73% Nukleotididentität zwischen den sehr variablen Isolaten TA278 und SANBAN, 57% im gesamten Genom) sie enthält aber auch einige Segmente höchster Homologie (90%) (Erker et al. 1999, Hijikata et al. 1999). Die translatierenden Bereiche (ORF) zeigen wieder eine außerordentlich hohe Variabilität. Der ORF1 des Isolates SANBAN codiert für ein 25 as kürzeres Protein mit nur 32% Aminosäurenidentität im Vergleich zu Prototyp TA278. Die Unterschiede sind besonders hoch im Zentralbereich des ORF1, in dem drei hypervariable Regionen (HVR's) 1-3 bestehen, die multiple Codon-Insertionen und Deletionen enthalten und in der Aminosäuren-Sequenz um bis zu 70% variieren (Takahashi et al. 1998, Erker et al. 1999).

Noch ausführlichere Untersuchungen zum Genom wurden mit Sequenzen aus der N22-Region betrieben. Bis jetzt wurden 16 Genotypen identifiziert, die per Definition weniger als 70% Sequenzhomologie aufweisen. Die Subtypen unterscheiden sich in der Regel um weniger als 15% in ihrer Sequenz (Okamoto et al. 1998, 1999). Die wachsende Anzahl von Isolaten widerspiegelt das Ausmaß der genetischen Heterogenität des TT-Virus, daher konnte die Heterogenität nicht in vollem Umfang erfasst werden. Gründe dafür sind auch die Vielzahl von Nachweisverfahren, die die Gesamtheit von zirkulierenden Viren nur suboptimal erfassen können (Okamoto et al. 1999, Biagini et al. 2001). Verwandte Viren wie CAV, porcines Circovirus und humanes Parvovirus B19 sind viel weniger variabel als TTV. Eine mögliche Hypothese zur Variabilität von TTV zielt darauf ab, dass das Virus schon seit Jahrtausenden existiert und einem starken Evolutionsdruck ausgesetzt war (Hijikata et al. 1999).

Andere Aspekte könnten die hohe Prävalenz, auch von TT-like Viren unter domestizierten Tieren sein (19% Hühner, 20% Schweine, 30% Schafe) (Nishizawa et al. 1999, Leary et al. 1999). Dies führt zu Transmissionen zwischen den Spezies, denn auch die jeweilige Anpassung an den neuen Wirt führt zu genetischen Veränderungen. Außerdem sind gemischte Infektionen mit multiplen Genotypen beschrieben worden (Ball et al. 1999, Mushahwar et al. 1999, Romeo et al. 2000), die die genetische Rekombination von humanen TT-Viren untereinander und mit verwandten Viren fördern und damit als wichtiger Faktor für die genetische Heterogenität gelten. Die Fähigkeit des TT-Virus, chronische Infektionen zu verursachen, gibt dem Immunsystem des Wirtes offenbar die Möglichkeit, dauerhaft Evolutionsdruck auszuüben (und damit genetische Variabilität zu erreichen) (Bendinelli et al. 2001, Prescott et al. 1999). Über das entsprechende Ausmaß existieren widersprüchliche Angaben, es wird von starker und nur moderater Veränderung des Virus beim Menschen während einer chronischen Infektion von 3-8 Jahren berichtet.

## **2.4 Virusreplikation**

Die genauen Mechanismen der Virusreplikation von TT-Viren sind bis heute unklar. Möglich ist eine primäre Übertragung in lymphoide Zellen, in denen das Virus im Zellkern repliziert wird und abhängig von zellulären Proteinen zu sein scheint, die während der S-Phase des Zellzyklus exprimiert werden.

Die Transkriptionsanalyse von CAV führte zur Identifizierung eines einzelsträngigen RNA-Transkripts von 2.0 kb Größe, welches die Funktion einer polycistronischen mRNA besitzt (Bendinelli et al. 2001). Die Abwesenheit von Motiven, die typisch für bekannte DNA-Polymerasen sind, führt zu der Annahme, dass das Genom von zellulären Enzymen repliziert wird. Der genaue Mechanismus der Replikation ist noch offen, aber es gibt molekulare Anzeichen dafür, dass Circoviren einen sogenannten „rolling-circle Mechanismus“ benutzen. Hierbei werden die Viruspartikel im Zytoplasma zusammengebaut und durch Zelllyse freigesetzt. Das VP3-Protein von CAV (auch als Apoptin bekannt) induziert einen p53-unabhängigen Weg der Apoptose, was als potentieller anti-tumor Faktor imponiert (Danen-Van Oorschot et al. 1997). Da TTV ebenfalls ein konserviertes REP-Protein Motiv besitzt, geht man auch hier von einem rolling-circle Mechanismus aus. Nach Gilbert und Dressler eignet sich dieses Verfahren zur Replikation einzelsträngiger DNA (Gilbert et al. 1968). Wahrscheinlich repliziert TTV in der Leber (Okamoto et al. 2000, Cheng et al. 2000).

## **2.5 Transmission des TT-Virus**

TTV-DNA konnte im Speichel, in der Muttermilch, in Fäzes, in Nasen- und Rachenabstrichen, in der Gallenflüssigkeit, sowie in diversen Geweben und Blut sowohl gesunder als auch infizierter Personen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde TTV-DNA im Liquor cerebrospinalis nur geringfügig oder gar nicht detektiert, was auf eine scheinbar schlechte Penetration des Virus via Blut-Hirn-Schranke hinweist (Maggi et al. 2001).

Obwohl bekannt ist, dass TTV sehr kontagiös ist, ist der Verbreitungsmodus letztlich nicht bekannt. Eine positive Korrelation besteht zwischen der Quantität der Blut- oder Blutproduktesubstitution und den TTV-Häufigkeitsraten (Takayama et al. 1999), was einwandfrei beweist, dass TTV ein durch Blut übertragbares Virus ist. Auch in Fäzes infizierter Patienten ist infektiöses TT-Virus nachweisbar (Ross et al. 1999, Romeo et al. 2000, Ukita et al. 1999). Dies lässt darauf schließen, dass die oral-fäkale Übertragung neben der parenteralen Transmission den häufigsten Weg darstellt. Auch bei nur niedrigem Virusgehalt des Stuhls ist die TTV-Virämie in der menschlichen Umgebung erstaunlich hoch, dies hängt offenbar mit der großen Anzahl von Virusträgern und der starken Resistenz des Virus gegenüber physikalisch-chemischen Einflüssen zusammen.

Die Übertragung von der Mutter auf das Kind (vertikale Transmission) ist bis heute nicht sicher geklärt. In früheren Studien konnte nur wenig oder gar kein Virusmaterial im Nabelschnurblut infizierter Mütter und bei Neugeborenen infizierter Mütter nachgewiesen werden (Sugiyama et al. 2001, Kazi et al. 2000, Gerner et al. 2000).

Darauf beruht die Vermutung, dass die kindliche Infektion hauptsächlich in der postnatalen Periode stattfindet (Gerner et al. 2000). Es existieren jedoch ebenfalls Hinweise, dass aufgrund heutiger verbesserter Detektionssysteme eine Transmission zwischen infizierter Mutter und Neugeborenem pränatal auftreten kann (Morrica et al. 2000, Saback et al. 1999). Kürzlich wurde TTV-DNA in über der Hälfte von Nabelschnurproben nachgewiesen (Matsubara et al. 2001), was eine diaplazentare Übertragung vor der Geburt vermuten lässt (Gerner et al. 2000), (Tabelle 2.2).

**Tabelle 2.2.: Häufigkeit** von TTV-DNA in Serum, Fruchtwasser und Muttermilch aus Yokohama et al. 1999.

Probenmaterial und Alter	Anzahl n	TTV positiv %
Maternales Serum	48	43 (89.6%)
Fruchtwasser	48	0 (0.00%)
Muttermilch	48	27 (56.3%)
Fetales Serum	48	0 (0.00%)
Kindliches Serum (<1 Jahr )	6	6 (100% )
Kindliches Serum ( 1 Jahr )	8	7 (87.5%)
Serum ( Vorschulalter 2-6 )	20	19 (95.0% )
Serum ( Schulalter 7-12 )	20	18 (90.0%)

Die sexuelle Übertragung scheint, anders als bei den Hepatitis B- und C-Viren (HBV, HCV), eine unbedeutende Rolle zu spielen. Es wurden keine signifikanten Prävalenzsteigerungen bei Personen mit erhöhtem Risiko für sexuell übertragbare Krankheiten (Prostituierte, Homosexuelle) gesehen (MacDonald et al. 1999, Mulyanto et al. 2000). Ebenfalls konnten durch Transfusion von Erythrozytenkonzentraten bedingte nosokomiale TTV-Infektionen (Matsumoto et al. 1999) und anders bedingte nosokomiale Infektionen nachgewiesen werden.

Pisani et al. (1999) konnten TTV-DNA auch in kommerziellen humanen Immunglobulinen (Ig) detektieren, wenn sie für den intramuskulären (i.m.) Gebrauch hergestellt wurden, nicht jedoch, wenn die komplementaktivierenden Aggregate für die intravenöse (i.v.) Applikation entfernt werden. Die Typen 1 und 2 sind gleichsam weltweit verteilt, auch wenn die Häufigkeiten stark in unterschiedlichen Gebieten variieren können (Prescott et al. 1999, 1998). Japanische Hämophilie-Patienten trugen öfters als nicht-Hämophilie-Patienten den Typ 2, so dass man hier von einer Abhängigkeit von der Substitution der jeweiligen Blutprodukte ausging (Kato et al. 1999).

## **2.6 Persistenz und Immunologie**

Eine Infektion mit dem TT-Virus verläuft normalerweise chronisch und ist durch eine dauerhafte Präsenz von großen Virusmengen im Blut charakterisiert. Dies spricht für eine erhebliche Fähigkeit von TTV zur Persistenz im Wirt (Viazov et al. 1998). Longitudinalstudien von Lefrère et al. (1999), Oguchi et al. (1999) und anderen zeigten eindeutig, dass die TTV-Infektion über mehrere Jahre bestand und dass die Möglichkeit einer lebenslangen Persistenz existiert (Matsumoto et al. 1999). Ob es selbst-limitierte Infektionen gibt, ist nicht bis ins Detail geklärt, einige Arbeiten berichten von plötzlichen Spontanremissionen einiger über Monate bis Jahre bestehenden Infektionen (Naoumov 2000, Lefrère et al. 1999, Irving et al. 1999, Takayama et al. 1999). Bei experimentell infizierten Schimpansen wurde dieses Phänomen ebenfalls beobachtet (Mushahwar et al. 1999). Es ist aber nicht ganz auszuschließen, dass es sich dabei in Wirklichkeit um geringere Virusmengen handelt (die durch verringerte Ausschleusung der Viruspartikel in die Blutbahn entstehen) oder dass erhöhte Viruselimination und verstärkte virale DNA-Veränderungen hierfür verantwortlich sind. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit stellt eine totale Viruseradikation (Bendinelli et al. 2001) dar. Es ist derzeit noch unklar, ob TTV-DNA in die Wirtszell-DNA integriert wird (wie bei anderen DNA-Viren), oder ob es sich als Episom verhält. Sowohl die Zellarten, in denen TTV seine primäre Amplifikation nach Eintritt in den Körper vollzieht, als auch die Zielgewebe und Organe aus denen frisches Virusmaterial in den Kreislauf gelangt, sind nicht sicher bekannt. Andere einzelsträngige DNA-Viren benutzen gewöhnlich aktivierte teilungsfähige Zellen für die Replikation. Von TTV wird angenommen, dass die Mehrzahl der Viren von zirkulierenden Zellen produziert wird.

TTV konnte in Lebergewebe und Gallenflüssigkeit in 10-100fach höheren Konzentrationen als im korrespondierenden Plasma und Fäkalextrakten nachgewiesen werden (Ross et al. 1999, Ukita et al. 1999). Dies spricht dafür, dass die Leber einen entscheidenden Stellenwert als Ort der Virusreplikation besitzt (Ukita et al. 1999). In einer kürzlich publizierten Arbeit von Okamoto et al. (2000) sind zirkuläre, doppelsträngige Replikationsfragmente von TTV durch in-situ Hybridisierung in der Leber und innerhalb von Hepatozyten gezeigt wurden. In peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC), außer denen der roten Blutzellreihe, konnte ebenfalls TTV-DNA nachgewiesen werden. Das lässt vermuten, dass das Virus in lymphoiden Zellen und Hepatozyten repliziert. Der Gehalt an TTV-DNA in frisch separierten PBMC und gereinigten B- und T-Lymphozyten, Monozyten und polymorphonukleären Leukozyten war gleichsam niedrig, was aus dem immunologischen Warte/Ruhezustand dieser Zellen resultieren könnte. Tatsächlich konnten Phytohämagglutinin-stimulierte PBMC mit TT-Virus infiziert werden, welche dann Mengen von infektiösem Virusmaterial freisetzten (Bendinelli et al. 2001). Unterstützt wird diese Hypothese durch Ergebnisse einer Studie über die myelosuppressive Therapie mit Cyclophosphamid und Ganzkörperbestrahlung nach einer Knochenmarkstransplantation (KMT). Es wurde gezeigt, dass eine vorher bestehende Virämie nicht mehr detektierbar war. Daraus schlussfolgern die Autoren Kanda et al. (1999), dass proliferierende hämatopoetische Zellen eine wichtige Quelle der TTV-Virämie repräsentieren. TTV hat offenbar die Fähigkeit sehr lange im Wirt zu persistieren. Ein möglicher Grund dafür ist, (vergleichbar mit HBV) die schon sehr frühe (pränatal, postnatal) Exposition und daraus resultierende Entstehung einer Persistenz.

Einen weiteren fördernden Aspekt stellt eine nur ungenügend induzierte Immunantwort bzw. nicht effizient genug produzierte Immuneffektoren dar, die die Infektion nicht kontrollieren können. Was bisher über die humorale Immunantwort bekannt ist, spricht nicht für die Entstehung einer starken antiviralen Aktivität bzw. für die Bildung von anti-TTV-Antikörpern. Der Mangel an passenden viralen Antigenen macht einen Wissensfortschritt in diesem Gebiet schwierig. Rekombinante 15kDa große Proteine aus der N22-Region von 2 TTV-Isolaten stellten sich als unwirksam im Western Blot gegen humane Seren heraus, unbeeinflusst davon, ob die Proben TTV-positiv oder negativ waren. In einer Studie von Tsuda et al. (1999) wurden ganze TT-Viren aus Fäkalextrakten als Antigen eingesetzt und eine anti-IgG-PCR zum Nachweis von Immunpräzipitation getätigt.

Von 44 Blutspendern waren bei 12 Personen anti-TTV-Antikörper vorhanden, wobei das Virus aber später im Plasma nicht mehr detektierbar war. Bei einem Patienten, der über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnte, waren anti-TTV-Antikörper über 4 Jahre lang vorhanden. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass bei chronisch TTV-Infizierten, nicht aber bei kürzlich infizierten Patienten, eine große Menge an zirkulierendem TTV mit Immunglobulinen der Gruppe IgG Komplexe bildete (Nishizawa et al. 1999). Vor der Entdeckung von TTV wurden in >20% der humanen Seren Antikörper gefunden, die mit dem Porcinen Circovirus reagierten (Tischer et al. 1995). Retrospektiv betrachtet weisen diese Daten auf die potentielle Existenz von kreuzreagierenden Antikörpern zwischen TTV und dem Porcinen Circovirus hin (Okamoto et al. 1999). Zusammenfassend zeigen die oben genannten Informationen, dass antivirale Antikörper in TTV-infizierten Personen gebildet werden, welche aber nicht in der Lage sind, das Virus in der Mehrzahl der Fälle zu neutralisieren. Weiterhin kann man sagen, dass bei Patienten mit gemischten Infektionen unterschiedlicher TT-Virustypen eine antivirale Immunität offenbar nicht ausreichte, (bzw. nicht vorhanden ist), um Superinfektionen mit anderen heterologen Subtypen zu verhindern.

## **2.7 Klinische Bedeutung**

Die Nachweise von erhöhten Transaminasen (ALT) und gleichzeitiger TT-Virämie bei 3 von 5 Bluttransfusionspatienten, bei denen TTV zuerst gefunden wurde, brachte Nishizawa et al. (1997) zu der Annahme, dass das Virus im Zusammenhang mit einigen Formen von akuter und chronischer Hepatitis sowie fulminantem Leberversagen steht. Aus der aktuellen Literatur lässt sich bisher kein spezielles Krankheitsbild feststellen, das direkt auf eine TTV-Virusinfektion zurückzuführen ist. Eine aktive TTV-Infektion verläuft offenbar klinisch inapparent. Griffith et al. (1999) veröffentlichten die Idee, dass TTV Teil der normalen humanen Mikroflora wäre. Diese Spekulationen basieren aber nur auf der bisher verfolgten Untersuchungs- und Fragestellungsstrategie über das TT-Virus (im Zusammenhang mit einer Ätiologiesuche für einige systematisch untersuchte Lebererkrankungen). TTV könnte, wegen seiner Fähigkeit in proliferationsaktivierten Lymphozyten zu replizieren, ein idealer Kandidat für unerklärliche immunsuppressive Syndrome sein. Das große Reservoir von TTV unter gesunden Individuen verlangt nach klinischen Studien, die die Verbindungen zu potentiellen Erkrankungen aufzeigen.



Neueste Untersuchungen von Maggi et al. (2003) deuten auch auf eine direkte Korrelation zwischen TTV-Infektion und dem Auftreten von akuten respiratorischen Erkrankungen hin, neuere Studien geben jedoch auch Anlass zu Zweifeln.

### **2.7.1 Leberschaden**

TTV ist -wie dargestellt- weit verbreitet und nicht nur unter Patienten mit kryptogener Zirrhose oder anderen Formen von Lebererkrankungen anzutreffen (Fukuda et al. 1999, Kanda et al. 1999, C. He et al. 1999). Hämophilie-Patienten und andere Personen, mit oder ohne Risiko einer parenteralen Virusinfektion - eingeteilt nach TTV-DNA-Positiven- und Negativen - zeigten vergleichbare Transaminasen-Werte (Parquet et al. 1999, Matsumoto et al. 1999, Takayama et al. 1999).

Bei Bluttransfusionspatienten gab es in einigen Studien keinerlei Korrelation zwischen dem Vorkommen von TTV und der Entwicklung einer Hepatitis. Genauso wenig war die Dynamik der ALT-Werte auf die TTV-Virämie zurückzuführen (Gimenez-Barcons et al. 1999, Irving et al. 1999, Lefrère et al. 1999). Das Ausmaß der Leberschädigung bei Patienten mit Hepatitis B, oder mit Hepatitis C (HBV, HCV) konnte ebenso wenig in Zusammenhang gebracht werden mit einer bestehenden TTV-Infektion wie auch das unterschiedliche Ansprechen auf eine Interferon-alpha-Therapie (Hijikata et al. 1999, Kanda et al. 1999). So erschien das erhöhte Ausmaß der biochemisch-histologischen Parameter des Leberschadens positiv korreliert zu sein mit einer Koinfektion mit TTV (Cleavinger et al. 2000, Tuveri et al. 2000). Nach einer Studie von Tanaka et al. (1999) über 26 Patienten mit fulminantem Leberversagen lag die Mortalität bei TTV-positiven Personen bei 100 %, gegenüber weniger als 50 % Sterblichkeit bei Nichtinfizierten. Experimentell- oder natürlich mit TTV- oder TT-like Viren infizierte Schimpansen zeigten keinerlei biochemische oder histologische Beweise einer signifikanten Leberzellzerstörung (Verschoor et al. 1999). Hepatitis C-Patienten (HCV), die eine Interferon alpha-Therapie erhielten, hatten keine nachweisbaren TTV-Werte im Blut, besonders wenn die Ursprungsviruslast gering war, eine maßgebliche Veränderung der Transaminasen (ALT) konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, solange HCV nicht eradiziert war (Akahane et al. 1999). Es konnte kein direkter Zusammenhang zwischen TTV-Infektion und der Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms bei HCV-, HBV-positiven Patienten erbracht werden (Tagger et al. 1999).

Aus den oben genannten Ergebnissen lässt sich unzweifelhaft ableiten, dass klinisch manifeste Lebererkrankungen keine häufige Konsequenz einer TTV-Infektion darstellen, andererseits konnten vereinzelte leichte Abnormitäten der Leberenzymverhältnisse gezeigt werden (Forns et al. 1999, Y. Kanda et al. 1999).

### **2.7.2 Extrahepatische Befunde**

Bis heute liegen nur geringe Erkenntnisse zur extrahepatischen Pathogenität vor. Bei Patienten mit Kryoglobulinämie konnte TT-Virus weder als Risikofaktor noch als Kofaktor ermittelt werden (Cacoub et al. 1999). Ambulant behandelte Kinder mit akuter Gastroenteritis zeigten höhere TTV-Werte im Vergleich zu anderen kindlichen Patienten (Iriyama et al. 1999), Diabetiker hatten eine um 50 % höhere Prävalenz der Virämie als die Kontrollgruppe (Gallian et al. 1999). Keinerlei Assoziation konnte zwischen TTV und dem Kawasaki Syndrom (Chua et al. 2000), Multipler Sklerose (MS) oder anderer zentralnervöser Störungen gefunden werden (Maggi et al. 2001). TTV-positive Patienten mit Rheumatoider Arthritis wiesen häufig stark erhöhte Prävalenzen von positiven Rheumafaktoren auf. Außerdem beschrieben Maggi et al. (1999), dass die TTV-Infektionsraten bei Patienten mit Psoriasis, Rheumatoider Arthritis oder systemischen Lupus erythematosus nicht höher sind als bei Gesunden. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Progression einer bestehenden HIV-Infektion und dem TT-Virus-Befall festgestellt werden (Christensen et al. 2000).

## **2.8 Koinfektion**

Möglicherweise spielt TTV als Kofaktor bei HCV-positiven Patienten mit Leberschaden eine Rolle. Hierbei wird angenommen, dass TTV in der Leber replizieren kann (Okamoto et al. 2000, Cheng et al. 2000) und somit in Ausnahmefällen Leberschäden induziert. Somit stellt sich das TT-Virus, ebenso wie z.B. viele andere Viren (Enteroviren, Adenoviren, Cytomegaloviren (CMV), Epstein-Barr-Viren (EBV), Masernviren, Rubellaviren und Influenzaviren) als ein Kandidat für die Entstehung einer kryptogenen Hepatitis dar. Diese sind dafür bekannt, Leberdysfunktionen unterschiedlicher Schwere bei Minderheiten der Patienten zu verursachen.

Manche Subtypen oder Varianten von TTV scheinen besonders hepatotrop zu sein (Itoh et al. 1999, Okamoto et al. 1999) wie z.B. bestimmte Enteroviren und Adenoviren - oder sie verursachen Krankheiten erst dann, wenn sie durch Superinfektion mit anderen Viren aktiviert werden (Takayama et al. 1999). Alternativ könnte es zur Leberschädigung kommen, wenn das Ausmaß der Virusreplikation über einem bestimmtem Grenzwert liegt oder große Mengen Virusmaterial inokuliert werden. Patienten, die zum ersten Mal mit TTV in Kontakt kommen, oder verschiedenen kreuzreaktiven/nicht-kreuzreaktiven Stämmen erneut ausgesetzt sind, sind stärker prädestiniert für eine Leberschädigung (Bendinelli et al. 2001). Die Umstände, unter denen das Virus entdeckt wurde (siehe oben), haben von vornherein die potenzielle klinische Bedeutung und Richtung geprägt.

## 2.9 Epidemiologie

Das TT-Virus wurde weltweit bei unterschiedlichen Personenkollektiven nachgewiesen. Trotz der unterschiedlichen Sensitivität der PCR-Assays konnte TTV in etwa *1/3* der Bevölkerung mit beachtlichen Unterschieden in verschiedenen Ländern, (mit anderen Untersuchungsverfahren auch innerhalb eines Landes) detektiert werden. Bei Testungen von Seren im Großraum Washington und Chesapeake wurden z. Bsp. unter Asiaten und Afroamerikanern höhere TTV-Raten gefunden als bei Kaukasiern. Auch geographisch getrennte Populationen, die nur geringen Kontakt mit der Außenwelt hatten, zeigten ebenfalls hohe TTV Virämien (Prescott et al. 1999). Dabei scheint die Virämie in sehr früher Kindheit gering zu sein und mit zunehmendem Alter anzusteigen, wobei sich ein Peak im frühen Erwachsenenalter oder später zeigt (Prescott et al. 1998). In neueren epidemiologischen Studien mit verbesserten PCR-Protokollen (z.B. der UTR-Region) wurde deutlich, dass die vorher ermittelten Prävalenzen deutlich die tatsächliche TTV-Verbreitung unterschätzten und dass man heute von viel höheren Werten ausgehen muss (Biagini et al. 2001). Neue Zahlen belegen, dass Virusträger in Dimensionen von *~80%* weltweit existieren, dabei heben sich manche Länder, wie Saudi-Arabien, Japan und Myanmar ab. (Okamoto et al. 2001, Itoh et al. 1999), (Tabelle 2.3).

Epidemiologische Daten zur Verbreitung des TT-Virus weltweit:

**Tabelle 2.3.: Epidemiologie.** Aktuelle Daten unterschiedlicher Kontinente von 1998 bis 2001.

Land	% positiv ORF 1-PCR	%positiv UTR-PCR	Genotypen	Literaturquelle
<b><u>Afrika</u></b>				
Kongo	43-44%		1,2, ANT*	Prescott et al. 1998
Ägypten	29%	85%	1,2	Abe et al. 1999
Gambia	86%		1,2, ANT	Prescott et al. 1998
Nigeria	52%		1,2,3, ANT	Prescott et al. 1998
<b><u>Asien</u></b>				
China	5-11%		1,2	Tsuda et al. 1999
Japan	10-58%	70-93%	1-8, ANT	Sugiyama et al. 2001
Korea	14%		1,2,4	Nakano et al. 1999
Mongolei	43%		1,2,4	Kato H. et al. 1999
Myanmar		96%	1,2	Abe et al. 1999
Nepal		82%	1,2,4	Abe et al. 1999
Saudi-Arabien	19%		1	Prescott et al. 1999
Singapur		100%		Simmonds et al.
Taiwan	10-53%	98%		Kao et al. 1999
Thailand	7-36%		1,2,3	Prescott et al. 1999
<b><u>Europa</u></b>				
Finnland	17%	73%		Simmonds et al.
Frankreich	5%		1,2, ANT	Biagini et al. 1998
Deutschland	7-14%		1,2,3,4, ANT	Berg et al. 1999
Italien	9-50%		1,2,3,4	Maggi et al. 1999
Spanien	14%		1,2, ANT	Gimenez-Barcons 1999
Niederlande		72%		Simmonds et al.
Großbritannien	2-10%	47-57%	1,2,3, ANT	Prescott et al. 1998
<b><u>Nordamerika</u></b>				
USA	1-11%		1,2,11	Desai et al. 1999
<b><u>Südamerika</u></b>				
Bolivien		82%	1	Abe et al. 1999
Brasilien	20-62%		1,2,3, ANT	Prescott et al. 1999
Kolumbien	16%		1,2,4	Tanaka et al. 1999
Equador	71%		1,2, ANT	Abe et al. 1999

## **2.10      Schlußfolgerungen**

Aus der aktuellen Literatur lässt sich bisher kein spezielles Krankheitsbild feststellen, das direkt auf eine TTV-Virusinfektion zurückzuführen ist. Eine aktive TTV-Infektion verläuft offenbar klinisch inapparent. Griffith et al. (1999) veröffentlichten die Idee, dass TTV Teil der normalen humanen Mikroflora wäre im Rahmen einer Ätiologiesuche für einige systematisch untersuchte Lebererkrankungen. TTV könnte, wegen seiner Fähigkeit in proliferationsaktivierten Lymphozyten zu replizieren, ein idealer Kandidat für unerklärliche immunsuppressive Syndrome sein. Das große Reservoir von TTV unter gesunden Individuen verlangt nach klinischen Studien, die die Verbindungen zu potentiellen Erkrankungen aufzeigen. Möglicherweise besteht eine direkte Korrelation zwischen der TTV-Infektion und akuten respiratorischen Erkrankungen (Maggi et al. 2003).

### 3. Ziele der Arbeit

Die nachfolgenden Untersuchungen sollen dazu beitragen, folgende Fragen und Probleme besser zu verstehen:

1. **Nachdem es in den letzten Jahren viele Studien zum weltweiten Vorkommen des TT-Virus gab, besonders bei Patienten mit Lebererkrankungen und mit erhöhten Leberparametern (ASAT, ALAT), sollte im Rahmen dieser Arbeit das Vorkommen von TT-Virus-Genomen in verschiedenen Kompartimenten des Geburtsapparates bei einer komplikationslosen Schwangerschaft gesunder Frauen in Mitteleuropa untersucht werden.**

Dazu diene der Genomnachweis von TT-Virus in **624** Gewebeproben von **268** Patienten, davon 114 Mutter-Kind-Paare und Materialien weiterer 34 Frauen, sowie eines neugeborenen Kindes.

2. **Wie ist die Epidemiologie des TT-Virus bei den Neugeborenen?**

Dazu sollten die unmittelbar nach der Geburt entnommenen neonatalen Seren von 115 Neugeborenen auf das Vorhandensein von TT-Virus geprüft werden. Diese Untersuchungen sollen helfen, aktuelle epidemiologische Daten bei dieser speziellen Untersuchungsgruppe zu verifizieren.

3. **Zum Verständnis der potentiellen Folgen einer TT-Virus-Infektion ist die Frage nach den Übertragungswegen wichtig. Nachdem bisher weder übereinstimmende Daten noch gesicherte Erkenntnisse dazu vorliegen, soll geprüft werden, ob Aussagen zur Transmission des Virus, bezogen auf das vorhandene Material, gemacht werden können**

Zur genotypischen Charakterisierung diente die Sequenzanalyse von 41 UTR-PCR-Produkten (inkl. 6 Mutter-Kind-Paar-Sequenzen). Zur Aufklärung des Sachverhaltes sind nur diejenigen Produkte sequenziert wurden, bei denen alle vorhandenen Probenmaterialien TT-Virus positiv getestet worden waren. Für die Sequenzanalyse diente der Abschnitt der untranslatierten Region des TTV-Genom. Zur Beantwortung dieser Fragestellung mussten die einzelnen Sequenzen und Sequenzpaare (Mutter-Kind) aligned und relevante Unterschiede oder Homologien aufgezeigt werden. Dabei stellte sich die Frage, ob die isolierten Abschnitte von TT-Virus auf Grund der beschriebenen hohen Sequenzstabilität der UTR identisch sind oder ob variable Bereiche existieren. Von besonderem Interesse war dabei das direkte Alignment der 6 Mutter-Kind-Sequenzen, und die Frage nach den Homogenitäten bzw. relevanten Divergenzen im Genom des TT-Virus in kindlichen und maternalen Proben. Außerdem sollten Aussagen zur evolutionären Eigenschaft des TT-Virus anhand der Unterschiede der Mutter-Kind-Paare gemacht werden.

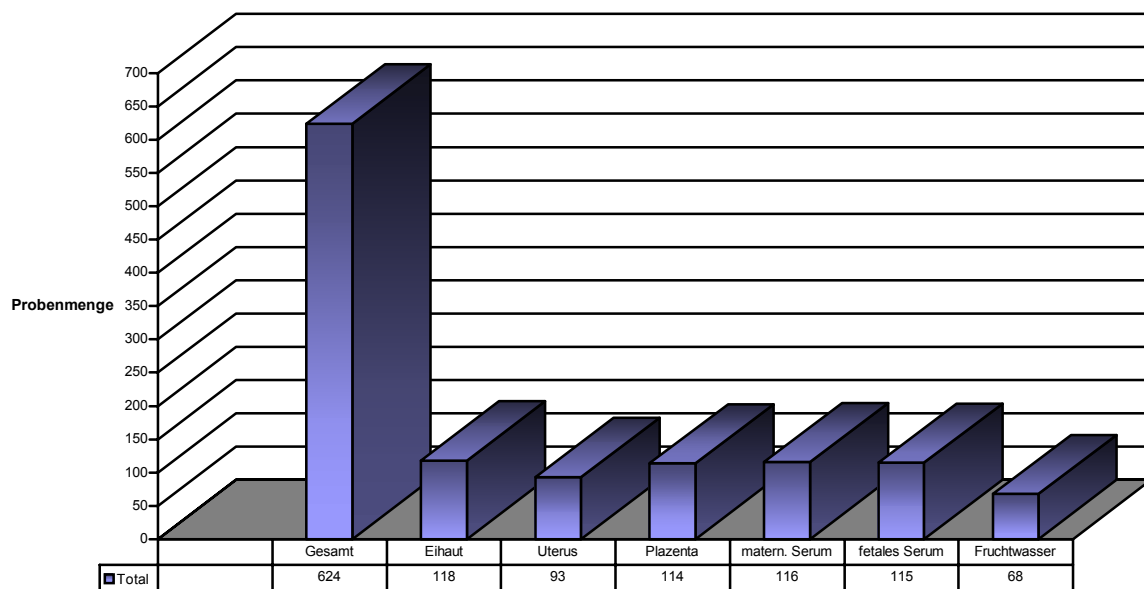
#### **4. Ist eine Einteilung in bekannte Geno/Subtypen möglich?**

Bisher sind 16 Genotypen und einige Subtypen des TT-Virus nachgewiesen. Die Genotypen 1a (TA278) und 2 (US 35 u.a.) treten weltweit am häufigsten sowohl in unterschiedlichen Patientenkollektiven als auch bei Gesunden auf (Bendinelli et al. 2001). Im Folgenden sollte geprüft werden, um welche Geno/Subtypen es sich im vorliegenden Patientengut handelt. Dazu war die Kompletengenomsequenz des TT-Virus aus den positiven Patienteneluaten nachzuweisen. Hiefür wurden verschiedene Primerbindungsregionen des TTV- Genoms sowie veröffentlichte und modifizierte Protokolle verwendet. Dabei sollten Aussagen zur Effektivität der beschriebenen Nachweismethoden gemacht und eine TTV-Kompletengenom-PCR etabliert werden.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Biologische Materialien

Die Entnahme der Materialien erfolgte unter der Geburt bei 148 Frauen zwischen 19 und 38 Jahren.



**Abb. 4.1. Probenverteilung Gewebekbank Frauenklinik FSU Jena.**

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Probenmaterial durch die Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Friedrich-Schiller-Universität Jena zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine Materialzusammenstellung von verschiedenen Geweben des Geburtsapparates bzw. des Foetus unter besonderen Bedingungen. Die Probenentnahme erfolgte ausschließlich während Schnittentbindungen (Sectio) bei 148 Frauen zwischen 19 und 38 Jahren und 115 Kindern (Tabelle 4.1). An dieser Stelle soll auf die Einmaligkeit des Untersuchungsmaterials hingewiesen werden. Durch die Art und Weise der Materialgewinnung während der Geburt konnten hierbei Aussagen zu Durchseuchung und vertikaler Transmission des TT-Virus getätigt werden.



Die Proben wurden unter sterilen Bedingungen gewonnen und anschließend bei -80°C in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe der Friedrich-Schiller-Universität Jena gelagert.

Die biologischen Untersuchungsmaterialien unterteilen sich in Gewebe und Flüssigkeiten.

**Tabelle 4.1.: Biologische Materialien.** Die Proben stammten von 263 Patienten.

<b>Bezeichnung</b>	<b>Probenart</b>	<b>Anzahl/Gesamt</b>
<b>Rot</b>	Eihaut	<b>118/624</b>
<b>Gelb</b>	Uterus	<b>93/624</b>
<b>Grün</b>	Plazenta	<b>114/624</b>
<b>MS</b>	Maternales Serum	<b>116/624</b>
<b>NS</b>	Neonatales Serum	<b>115/624</b>
<b>FW</b>	Fruchtwasser	<b>68/624</b>

Daraus ergeben sich unterschiedliche Wege zur Isolierung der Nukleinsäuren.

## **4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **4.2.1 DNA-Präparation der Gewebe**

Hierfür wurden QIAamp DNA-Tissue-Kits der Firma Qiagen-GmbH; Hilden benutzt. 25 mg des jeweiligen Ausgangsgewebes wurden bei Zimmertemperatur aufgetaut und mit Hilfe autoklavierter Skalpelle steril in kleine Stücke zerteilt und anschließend in 2 ml EPPENDORF Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden 180 µl ATL Puffer und 25µl Proteinase K dazu gegeben, kräftig gemischt und bei 56°C für 3h bis zur vollständigen Lyse im Thermomixer EPPENDORF 5437 inkubiert. Als nächster Schritt wurden 200µl Puffer AL zugegeben und die Proben für 10 min. bei 70°C inkubiert. Nach Addition von 210µl Ethanol wurde die gesamte Mischung einschließlich Präzipitat auf die QIAamp Spinsäule gegeben, bei 8000 rpm für eine Minute zentrifugiert (EPPENDORF Minizentrifuge 5415 D) und der Überstand verworfen.

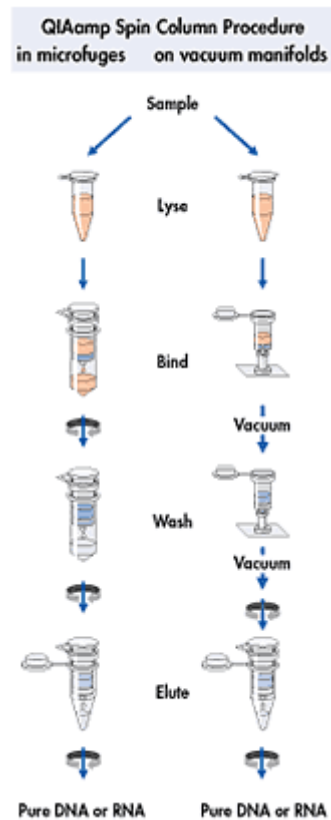


Abb. 4.2: Säulenfiltertechnik QIAamp Spin Column, Qiagen GmbH; Hilden.

### Prinzip:

Das QIAamp Verfahren zur Präparation von DNA besteht im Prinzip aus drei Schritten und wird mit den Spinsäulen in einer Standard-Mikrozentrifuge durchgeführt.

1. Adsorption an die QIAamp Membran
2. Entfernen verbliebener Kontaminationen
3. Elution reiner Nukleinsäuren

Beim ersten Schritt wird die DNA während eines Zentrifugationsschrittes an einer Silicagel-Membran gebunden. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der an die Membran gebundenen DNA mit jeweils 500µl Puffer AW1 und Puffer AW2. Um Reste von Äthanol zu beseitigen, schließt sich eine Zentrifugation von 1 min bei 14.000 U/min an. Zum Abschluss wird die gereinigte DNA mit 2x100 µl AE-Puffer eluiert und bei -70°C gelagert.

#### 4.2.2 DNA-Präparation der Flüssigkeiten

Die Präparation erfolgte entsprechend der Vorschrift des QIAamp-DNA-Mini Kits. Es wurden 400 µl der Seren oder 1ml Fruchtwasser entnommen, wobei die Fruchtwasserproben für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µl aufgenommen wurden. Danach wurde mit 20µl Protease und 200µl Puffer AL für 10 min. bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde 210µl Äthanol zugegeben und eine weitere Aufarbeitung entsprechend der oben beschriebenen Prozedur durchgeführt. Zum Abschluss wurde die DNA mit 2x70 µl Puffer AE eluiert und bei -70°C gelagert.

#### 4.2.3 GAPDH und $\beta$ -Actin Nachweis

Zur Qualitätskontrolle der DNA-Aufreinigung wurde ein House-Keeping-Gen-Nachweis bei den ersten 20 Proben durchgeführt. Aus den Gewebeproben erfolgte der  ***$\beta$ -Actin***-Nachweis und aus den Seren die Amplifikation des Kontrollgens, das für die Glyzerinaldehydphosphat-dehydrogenase (***GAPDH***) kodiert. Die Primersequenzen sind aus Tabelle 4.2 ersichtlich.

#### 4.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Photospektrometrie

Die Ausbeute von DNA wird über die photometrische Messung der Nukleinsäure-Konzentration der Eluate bei 260 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von einem Zentimeter bestimmt. Eine Extinktion von 1,0 (1 OD<sub>260</sub>) entspricht einer Konzentration von etwa 50 µg doppelsträngiger DNA/ml bzw. 33 µg einzelsträngiger DNA/ml bzw. 40 µg RNA/ml.

Wir berechneten die DNA-Menge nach folgender Formel:

$$\text{DNA-Gehalt } (\mu\text{g}) = \frac{\text{OD-Wert} \cdot 50 \text{ (DNA)} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \cdot \text{Elutionsmenge} \\ (2 \times 70 \mu\text{l od. } 2 \times 100 \mu\text{l})$$

Die eingesetzte Konzentration der Eluate für die PCR-Reaktion liegt im Bereich von 0,1 µg DNA/5 µl Eluat bei den Flüssigkeiten und den Geweben. Beim **Maternalen Serum** (MS), welches die höchsten Detektionsraten aller vorhandenen Gewebearten aufwies, konnten durchschnittlich geringere DNA-Mengen mit **0,984 µg/140 µl** erzielt werden als beim **Neonatalen Serum** (NS), welches die niedrigsten Detektionsraten hatte und durchschnittliche DNA-Mengen von **1,896 µg/140 µl** aufwies. Ähnliches gilt für das **Fruchtwasser** (FW) mit **3,04 µg/140 µl** oder das **Plazentagewebe** (Grün) mit **68,28 µg/200 µl**. Für den eigentlichen TTV-Nachweis durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden in etwa gleiche DNA-Mengen bei den unterschiedlichen Materialien eingesetzt. Dabei wurden 5 bzw. 10 µl Probe in die PCR als Ausgangsmaterial für den Nachweis der UTR-Region gegeben.

#### 4.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäure-Moleküle und -Fragmente können zu analytischen und präparativen Zwecken durch Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Je nach Größe der Moleküle werden Gele mit unterschiedlicher Agarosekonzentration eingesetzt. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten zwischen 100 bis 1000 bp werden 2%ige Agarosegele, für DNA-Fragmente von 500 bp bis 10 kbp 1%ige Gele verwendet. Zur Anfärbung der Nukleinsäure wird der Agarose 0,02% Ethidiumbromid zugesetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nukleinsäuren und lässt sie nach Bestrahlung mit ultraviolettem Licht (305 nm bzw. 366 nm) als hellrote Banden aufleuchten.

Als Lauf- und Gel-Puffer wird ein Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE) verwendet. Die DNA-Proben werden mit 1/6 Volumen Ladepuffer gemischt.

Als Längenstandard wird bei 0,8- bzw. 1%igen Gelen Hin dIII-geschnittene DNA des Phagen  $\lambda$  und bei 2%igen Agarosegelen Hae III-geschnittene DNA des Phagen  $\Phi$ X 174 aufgetragen. Hin dIII-geschnittene DNA muss nach Zugabe des Ladepuffers zusätzlich bei 65 °C erhitzt werden, um die kohäsiven Enden der Phagen-DNA (cos) zu denaturieren. Die Proben werden in die Probentaschen des mit Laufpuffer überschichteten Agarosegels gefüllt. Die Auftrennung der DNA erfolgt je nach Größe des Gels bei einer Spannung von 80-100V (entspricht einem Stromfluß von ca. 40-80 mA). Nach der Elektrophorese wird das Agarosegel unter UV-Licht betrachtet und das Ergebnis dokumentiert.

#### **4.2.6      Aufreinigung der PCR-Produkte für die Sequenzierung**

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt mit Hilfe kommerzieller Kits der Firma Qiagen, Hilden (QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit), wobei Säulensysteme verwendet werden. Dabei kommen zwei unterschiedliche Verfahren zur Anwendung, **1.** die Aufreinigung nach Isolation der Bande aus dem Agarose-Gel oder **2.** die direkte Reinigung des TT-Virus-Amplifikats mittels QIAquick PCR-Purification-Kit.

##### **4.2.6.1      Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen**

Im elektrischen Feld werden die DNA-Fragmente durch unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten im Agarosegel aufgetrennt. Die DNA wird unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH; Hilden) entsprechend der Vorschrift extrahiert und aufgereinigt. Dazu wird zunächst das gewünschte Fragment aus dem Agarosegel (im Gel als Bande zu erkennen) mit einem scharfen, sauberen Skalpell unter Minimierung der überstehenden Agarose herausgeschnitten. Das herausgeschnittene Gelstück (enthält DNA) wird gewogen und in ein Eppendorfgefäß gegeben. Anschließend wurde das Gel-Stück mit Puffer QG vermischt.

Nach Inkubation für 10 min bei 50°C und Vortexen hatte sich das Stück vollständig aufgelöst. Anschließend wurde Isopropanol zugegeben. Die Bindung der DNA an die Säule erfolgte mittels Zentrifugation in den speziellen QIAquick Säulensystemen.

Anschließend wurde die Säule mit Puffer PE gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Elution der gebundenen DNA-Fragmente erfolgt mit 30 µl Elutionspuffer EB.

#### **4.2.6.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus PCR-Produkt**

Zur Beseitigung von störenden Primern, Nukleotiden, Polymerase und Salzen aus dem PCR-Ansatz, wurde das QIAquick PCR-Purification-Protokoll der Firma Qiagen GmbH; Hilden durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde hierbei mit PB-Puffer vermischt und über ein Säulensystem (Firma Qiagen GmbH; Hilden, siehe oben) gegeben. Nach anschließendem Zentrifugieren und mehrmaligen Waschens mit PE-Puffer konnte die DNA in 30µl Elutionspuffer EB eluiert werden.

#### 4.2.7 Oligonukleotidprimer

Für die einzelnen Nachweismethoden wurden spezifische Primer aus der aktuellen Literatur gewählt und im Einzelfall modifiziert bzw. neu definiert (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2.: Oligonukleotidprimer** der verschiedenen Nachweismethoden.

Bezeichnung	Primer	Position	Verwendung
<b>GAPDH 1</b>	5' AATGCTCCTGCACCACC 3'	3932-3950	<b>Amplifikation von GAPDH</b>
<b>GAPDH 2</b>	5' ATGCCAGTGAGCTTCCCG 3'	4355-4373	
<b>GAPDH 4</b>	5' GACAACAGCCTCAAGATCATC 3'	3816-3837	
<b>GAPDH 5</b>	5' GACGGCAGGTCAGGTCCACCA 3'	4405-4426	
<b>Sense</b>	5' GTGGGGCGCCCCAGGCACCA 3'	167-187	<b>Amplifikation humanes <math>\beta</math>-Actin</b>
<b>Antisense</b>	5' CTCCTTAATGTACGCACGATTTTC 3'	682-706	
<b>NG 133</b>	5' GTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAG 3'	91-115	<b>Amplifikation der UTR (untranslatierte Region)</b>
<b>NG 147</b>	5' GCCAGTCCCGAGCCCGAATTGCC 3'	211-233	
<b>NG 134</b>	5' AGTTTTCACGCCCCGTCCGCAGC 3'	114-136	
<b>NG 132</b>	5' AGCCCGAATTGCCCTTGAC 3'	204-223	
<b>NG 147</b>	5' GCCAGTCCCGAGCCCGAATTGCC 3'	211-233	<b>Sequenzierung der UTR</b>
<b>NG 133</b>	5' GTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAG 3'	91-115	<b>Amplifikation des TTV-Komplettgenom (Okamoto et al. 1999)</b>
<b>NG 135</b>	5' GCGGCTGTGACGTCACTGGAACGG 3'	3454-3477	
<b>NG 134</b>	5' AGTTTTCACGCCCCGTCCGCAGC 3'	114-136	
<b>NG 136</b>	5' ACGTCACTGGAACGGCCATTTTGG 3'	3444-3467	
<b>NG 133</b>	5' GTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAG 3'	91-115	<b>Amplifikation des TTV-Komplettgenom (Zell, Langner 2002)</b>
<b>NG RL-1</b>	5' ATGGCGAAGTCTGGCCCCACTCAC 3'	3343-3366	
<b>NG 134-A</b>	5' AGTTTATGCCGCCCCGTCCGCAGC 3'	114-136	
<b>NG RL-2</b>	5' GAAGTCTGGCCCCACTCACTTTTCG 3'	3338-3361	

#### 4.2.8 Oligodesoxyribonukleotidsynthese

Synthetische Oligonukleotide wurden sowohl für die Virusdetektion als auch für die Sequenzierung eingesetzt. Diese Primer wurden nach der Phosphoramiditmethode (Caruthers et al. 1983) von Dr. E. Birch-Hirschfeld im Institut für Virologie und antivirale Chemotherapie der FSU Jena auf einem DNA/RNA-Automaten der Firma Per-Septive Biosystems Modell Expedite TM-8909 synthetisiert. Nach der Synthese wurden die Oligonukleotide in Ammoniak mindestens sechs Stunden (eventuell über Nacht) bei 55 °C inkubiert, um die alkalilabilen Basenschutzgruppen zu entfernen. Nach Verdampfen des wässrigen Ammoniaks wurde das getrocknete Syntheseprodukt in *aqua dest.* aufgenommen und die Konzentration durch OD-Messung bei 260 nm bestimmt (siehe Tabelle 4.2).

#### 4.2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zum Nachweis von UTR-DNA des TT-Virus

DNA wurde durch Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Virusdetektion oder Sequenzierung nach dem Prinzip von Saiki et al. (1986) amplifiziert. Wenige Moleküle einer Matrizen-DNA können mit Hilfe spezifisch bindender Oligodesoxyribonukleotide als Startermolekül für eine *in vitro*-DNA-Synthese mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Das Schlüsselenzym hierbei ist die DNA-Polymerase der thermophilen Bakterien *Thermus aquaticus*, weil sie als thermostabile Enzyme eine zyklische Abfolge von Denaturierungs-, Hybridisierungs- und DNA-Kettenverlängerungsschritten mit Hilfe spezifischer Primer ermöglichen. Der erste Schritt der PCR-Vervielfältigung ist die Denaturierung der Matrizen-DNA bei 92-95 °C in DNA-Einzelstränge. Die Matrizen-DNA kann dabei je nach Versuch bis zu 10 Kbp und größer sein. Der zweite Schritt ist das Hybridisieren des Primers (Annealing) bei 55 °C, bei dem die Oligodesoxyribonukleotide spezifisch an die DNA-Matrizenstränge binden. Im dritten Schritt fand die Polymerisation (Kettenverlängerung) der DNA bei 72 °C statt.

Die PCR-Bedingungen sind von einer Vielzahl von Parametern abhängig (z.B. Anzahl und Reaktionszeiten der PCR-Zyklen, Menge und Größe der zu amplifizierenden DNA). Häufig wird ein längerer Denaturierungsschritt (5 min. bei 95 °C) vorangestellt und ein abschließender Kettenverlängerungsschritt (5 min. bei 72 °C) angehängt, um die Ausbeute an amplifizierter DNA zu erhöhen.



In Abhängigkeit von Templatelänge und Verwendungszweck des Amplifikates wurden die PCR Bedingungen modifiziert und unterschiedliche Polymerasen verwendet. Dabei kamen folgende Polymerasen zum Einsatz: Ampli-*Taq*-Polymerase von *Thermus aquaticus* (bis 3 Kbp), CombiPol-Polymerase (bis 7 Kbp) oder die HotStar-*Taq*-Polymerase (bis 2 Kbp).

Eine Zusammenstellung der verwendeten Polymerasen kann der Tabelle 4.3. entnommen werden.

**Tabelle 4.3.: PCR-Ansatz und verwendete DNA-Polymerasen.**

Gewünschte Fragmentlänge	Verwendete DNA-Polymerasen	Reaktionsbedingungen
bis ca. 3 kbp	Ampli- <i>Taq</i> -Polymerase	10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.001 %, dNTP je 0.2 mM, Primer je 10 pM, 2.5 U Enzym;
bis ca. 7 kbp	CombiPol-Polymerase	20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, 50% Glycerol, 0.5% Tween 20, 500 mM OptiPerformKOH, 0.1% Tween 20, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 160 mM NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , OptiZyme Enhancer (Inhalt nicht veröffentlicht); dNTP je 0.5 mM, Primer je 10 pM, 2 U Enzym;
bis ca. 2 kbp	HotStar <i>Taq</i> -Polymerase	20mM Tris-HCl, 100mM KCl, 1mM DTT, 0,1mM EDTA, 50% Glycerol, 0,5% Tween20, 0,5% Nonidet P-40, 15mM Mgcl <sub>2</sub> , 2 U Enzym;

Die Amplifikation der untranslatierten Region des TT-Virus erfolgte initial durch eine thermostabile *Taq*-Polymerase (Ampli *Taq*), später durch den Einsatz der HotStar-*Taq*-Polymerase mit veränderten Reaktionsbedingungen, diese Reaktion wurde automatisch in einem Thermal Cycler (PE APPLIED BIOSYSTEMS GENEAMP PCR System 9700) durchgeführt.

Tabelle 4.4.: PCR-Protokolle der einzelnen Gene.

<b>GAPDH nested PCR</b> mit 2x 38 Zyklen <b>1.PCR/2.PCR</b> für Taq- Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> ) in 50 µl <b>und</b> <b>β-Actin PCR</b> mit 38 Zyklen für Taq-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> ) in 50 µl	1) Denaturierungsschritt: 2) 38 Zyklen  3) Kettenverlängerungsschritt: 4) anschließend:	5 Minuten bei 94 °C 1 Minute bei 95 °C 50 Sekunden bei 94 °C 50 Sekunden bei 55 °C 1 Minute bei 72 °C 5 Minuten bei 72 °C auf 4 °C abkühlen und warten.
<b>UTR-A nested PCR</b> mit 35 bzw. 25 Zyklen (Okamoto 1999)  für HotStar Taq-Polymerase ( <i>Thermus aquaticus</i> ) in 50 µl	1) Denaturierungsschritt: 2) 35 Zyklen/25 Zyklen  3) Kettenverlängerungsschritt: 4) anschließend:	15 Minuten bei 95 °C 40 Sekunden bei 95 °C 40 Sekunden bei 60 °C 60 Sekunden bei 72 °C 7 Minuten bei 72 °C auf 4 °C abkühlen und warten.
<b>Sequenzierungs-PCR</b> mit 25 Zyklen	25 Zyklen  Kettenverlängerungsschritt: anschließend:	10 Sekunden bei 96°C 5 Sekunden bei 50°C 4 Minuten bei 60°C auf 4 °C abkühlen und warten

Die 1. Reaktion der nested-UTR-PCR bestand aus **35 Zyklen** mit 15 Minuten Hitzedenaturierung bei 95°C, 40 Sekunden Primerannealing bei 95°C und 7 Minuten Polymerasereaktion (DNA-Synthese) bei 72°C, die 2.PCR bestand aus **25 Zyklen** mit gleichem Ablauf.

Die PCR-Fragmente wurden - je nach Erfordernis - mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen GmbH; Hilden) direkt aufgereinigt oder nach Agarosegelelektrophorese aus dem Gel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden).



**Abb. 4.3: TTV-UTR-A PCR-Produkte.**

Positiv: 62MS, 63MS, 71G, 73G, 84GR, 86MS, 91R, 103MS, 120R, 125MS, 136MS

Negativ: 96R, 105G, 127GR, 155GR. Pfeil markiert Höhe bei 109 bp.

#### 4.2.10 Automatisierte DNA-Sequenzierung

##### 4.2.10.1 Sequenzierung der untranslatierten Region (UTR)

DNA wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger *et. al.* (1977) unter Verwendung des Applied Biosystems Sequenziergerätes ABI PRISM<sup>TM</sup> Cycle Sequencer 310 sequenziert.

Als Terminatoren wurden farbstoffmarkierte Didesoxyribonukleotide eingesetzt, die im sog. Cycle-Sequencing-Verfahren von einer modifizierten *Taq*-Polymerase in die wachsende DNA-Kette eingebaut werden.

Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über eine polymergefüllte Kapillare. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden dann mit Hilfe eines Argonlasers detektiert. Die dabei gewonnenen Rohdaten wurden anschließend vom Prism 310-Analyseprogramm ausgewertet.

Für die Sequenzierung des gereinigten PCR-Amplifikats wurde die Sequenzierungsreaktion im PCR Thermocycler mit einem Mastermix, bestehend aus 1 µl Primer NG 147 5pMol/µl, 1 µl Template DNA plus 6 µl H<sub>2</sub>O sowie 2 µl Sequenzierungsreagenz durchgeführt. Zur Sequenzierung von PCR-Fragmenten wurde das Cycle-Sequencing-Verfahren (Sears et al. 1992; Slatko et al. 1996) nach den Angaben des Herstellers (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt) durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt (10µl) wurde mit 90 µl H<sub>2</sub>O und 10 µl 3M NaAC gemischt. Es folgt die Fällung der fluoreszenzmarkierten DNA bei Raumtemperatur mit 250 µl 100%igen Ethanol. Daran schließt sich eine Zentrifugation von 15 min bei 15.000 U/min bei Raumtemperatur an. Der Überstand wurde vorsichtig abgehoben und das Pellet mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15.000 U/min wurde das Pellet in der Speedvac-Zentrifuge getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe von 20 µl Template-Suppression-Reagent-Puffer (TSR), eine 2 minütige Inkubation bei 90°C und die Kühlung auf Eis. Das PCR-Produkt wurde anschließend unter Verwendung des Sequenziergerätes ABI PRISM™ Cycle Sequencer 310 sequenziert.

#### 4.2.10.2 Sequenzierung des TT-Virus Kompletengenoms

Nach dem erfolgreichen Sequenzieren der untranslatierten Region sollte die Kompletengenomsequenz des TT-Virus aus dem vorhandenen Probenmaterial bestimmt werden.

Kompletengenom ~ **3835 nt** (Bendinelli et al. 2001), unterteilt in verschiedene Regionen:

1. **UTR**= nicht-translatierte stabile Region von 0-300 nt und von 3134-3760 nt
2. **ORF**= open reading frames (ORF 1-3) wenig konstant mit hypervariablen Regionen, **ORF-1** von 589-2898 nt, **ORF-2** von 107-712 nt, **ORF-3** von 2904-3074 nt
3. **N22**= hochvariabel, von 1847-2346 nt

Es wurden zunächst Primer aus der Literatur definiert, außerdem eigene Primerpaare (Tabelle 4.2.), anhand umfangreicher manueller Sequenzalignments, sowie mit Hilfe des ClustalV-Alignments (Thompson et al. 1994) unterschiedlicher Genotypen des TTV (siehe Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5.: TT-Virus.** Ausgewählte Stämme, GenBank Acc.No. und Größe.

<b>Serotyp</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>GenBank Acc.No.</b>	<b>Größe</b>
<b>TT-Virus Genotyp 1a TA278</b>	TA278	AB017610	3853 bp
<b>TT-Virus Isolat CG</b>	CG	AB008394	3739 bp
<b>TT-Virus Isolat BDH 1</b>	BDH1	AF116842	3739 bp
<b>TT-Virus Isolat CH65-1</b>	CH65-1	AB037926	3899 bp
<b>TT-Virus Isolat SANBAN</b>	SANBAN	AB025946	3808 bp
<b>TT-Virus Isolat TNJ01</b>	TJN01	AB028668	3787 bp
<b>TT-Virus Genotype 11 TUS01</b>	TUS01	AB017613	3818 bp
<b>TT-Virus Isolat san-S039</b>	san-S039	AB038620	3792 bp

### 4.3 Geräte und Hilfsmittel

Nachfolgend aufgeführte Geräte und Hilfsmittel in tabellarischer Zusammenstellung:

**Tabelle 4.6.: Geräte und Hilfsmittel**

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseauswertesystem (E.A.S.Y.)	Herolab GmbH; Wiesloch
Feinwaage	Sartorius AG; Göttingen
Gelelektrophoresekammer Easy Cast™	AGS Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH; Heidelberg
37°C Inkubator	Heraeus; Hanau
37°C Schüttelinkubator	Inova™ 4000 New Brunswick Scientific; Edison, NJ, USA
Photometer Shimadzu	Dynatech MR 500 UV-160A UV- Visible) Recording Spectrometer
Reaktionsgefäße 0.2 ml, 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg
Reaktionsgefäße 50 ml	Greiner Labortechnik GmbH; Frickenhausen
Sequenzierer ABI Prism® 310 Genetic Analyzer	Applied Bio Systems GmbH; Darmstadt
Stromversorgungsgeräte (Electrophoresis Power Supply EPS 200)	Amersham Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ, USA
Thermocycler Gene Amp® PCR System 9700	Applied Biosystems GmbH; Darmstadt
Ultraviolettgerät für Agarosegele	Herolab GmbH; Wiesloch
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH; Hamburg
Minizentrifuge Eppendorf 5415 D	Hamburg
Thermoblock	Liebisch
DNA-Synthesegerät Expedite TM8909	Per-Septive Biosystem Framingham, MA, USA

#### 4.4 Chemikalien, Enzyme, Marker, Kitsysteme

Nachfolgend aufgeführte Materialien in tabellarischer Zusammenstellung:

**Tabelle 4.7.: Verwendete Polymerasen**

Name	Hersteller	
Aktivität (U/µl)		
CombiPol DNA Polymerase	InViTek GmbH;13125 Berlin-Buch	4
Expand™ Long Template PCR	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	3,5
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen GmbH; Karlsruhe	5
Taq DNA Polymerase	Q-Biogene; Heidelberg	5
Hot Star Taq DNA Polymerase	Qiagen-GmbH, Hilden	5

**Tabelle 4.8.: Verwendete Chemikalien:**

Name	Hersteller
Agarose	Gibco-Life Technologies GmbH; Eggenstein
Bromphenolblau	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
DTT	Gibco-Life Technologies GmbH; Eggenstein
dNTPs	Promega, über Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
EDTA	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
Ethanol, 96%ig	Merck KGaA; Darmstadt
Ethidumbromid	Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG; Heidelberg
MgCl <sub>2</sub>	Fluka-Sigma-Aldrich-Chemie GmbH; Deisenhofen
NaCl	Serva Feinbiochemica GmbH&Co KG;Heidelberg

Tabelle 4.9.: Verwendete DNA-Marker:

Name	Hersteller	Fragmentgröße
DNA Molecular-Weight Standard Lambda DNA-Hind III	AGS GmbH; Heidelberg	8 Fragmente mit Größen von 23130, 9416, 6557, 4361, 2322, 2027, 564 und 125 bp
DNA Molecular-Weight Standard phiX 174 DNA-Hae III	AGS GmbH; Heidelberg	11 Fragmente mit Größen von 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 und 72 bp

Tabelle 4.10.: Verwendete Kits und gebrauchsfertige Komponenten:

Name	Hersteller	Verwendung
DNA Sequencing Kit	Perkin Elmer	DNA Sequenzierung
Big Dye™ Terminator v 2.0 cycle sequencing reaction	Applied Biosystems GmbH; Darmstadt	
High Pure PCR Purification Kit	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim	Aufreinigung von PCR-Produkten
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen GmbH; Hilden	Aufreinigung von PCR-Produkten
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH; Hilden	Extraktion von DNA aus Agarose- Gelen
QIAamp DNA Tissue Kit	Qiagen GmbH; Hilden	Aufarbeitung von Gewebe
QIAamp DNA Blood Kit	Qiagen GmbH; Hilden	Aufarbeitung von Flüssigkeiten



**Tabelle 4.11.: Reagenzien für die Gelelektrophorese:**

<i>TBE-Puffer</i> (pH 8,1) 5-fach:	54 g Tris 27,5 g Borsäure 4,65 g EDTA auf 1000 ml Aqua dest.
<i>Ladepuffer:</i>	40 % Glycerol 0,1 % EDTA 0,1 % SDS 0,2 % Bromphenolblau
<i>Gelansatz 0,8 %ig :</i>	60 ml 1 x TBE-Puffer 0,48 g Agarose 6 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml)
<i>Gelansatz 2 %ig :</i>	60 ml 1 x TBE-Puffer 1,2 g Agarose 6 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml)

Puffer und Enzyme für DNA-Aufarbeitung und PCR:***TE-Puffer***

Der Puffer setzt sich zusammen aus 10 mM Tris und 1mM EDTA, pH-Wert 7,6.

***DEPC-Wasser***

1 l Aqua bidest. wurde mit 1 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

***dNTP-Mix***

Dafür werden 5 µM dATP, 5 µM dCTP, 10 µM dGTP und 5 µM dUTP in 10mM Tris-HCL Puffer, pH 8,0 gelöst.

Tabelle 4.12.: Puffer und Enzyme für DNA-Elution

Name	Hersteller	Verwendung
Puffer ATL	Qiagen GmbH; Hilden	Aufarbeitung der
Puffer AL	Qiagen GmbH; Hilden	Gewebe und
Puffer AW1,2	Qiagen GmbH; Hilden	Flüssigkeiten
Puffer AE	Qiagen GmbH; Hilden	Elutionspuffer
Proteinase K	Qiagen GmbH; Hilden	Zelllyse der Gewebe
Protease	Qiagen GmbH; Hilden	Zelllyse der Flüssigkeiten
RNAse A	Qiagen GmbH; Hilden	Degradation störender RNA

Tabelle 4.13.: Reagenzien für die Sequenzierung der PCR-Produkte

Name	Hersteller
Ethanol	
Isopropanol	
TSR-Puffer	Qiagen GmbH; Hilden
QG-Puffer	Qiagen GmbH; Hilden
10mM Tris-HCl Puffer	Qiagen GmbH; Hilden
Formamid loading dye	Amersham Biosciences
EB-Puffer (Elution)	Qiagen GmbH; Hilden
PE-Puffer (Waschen)	Qiagen GmbH; Hilden

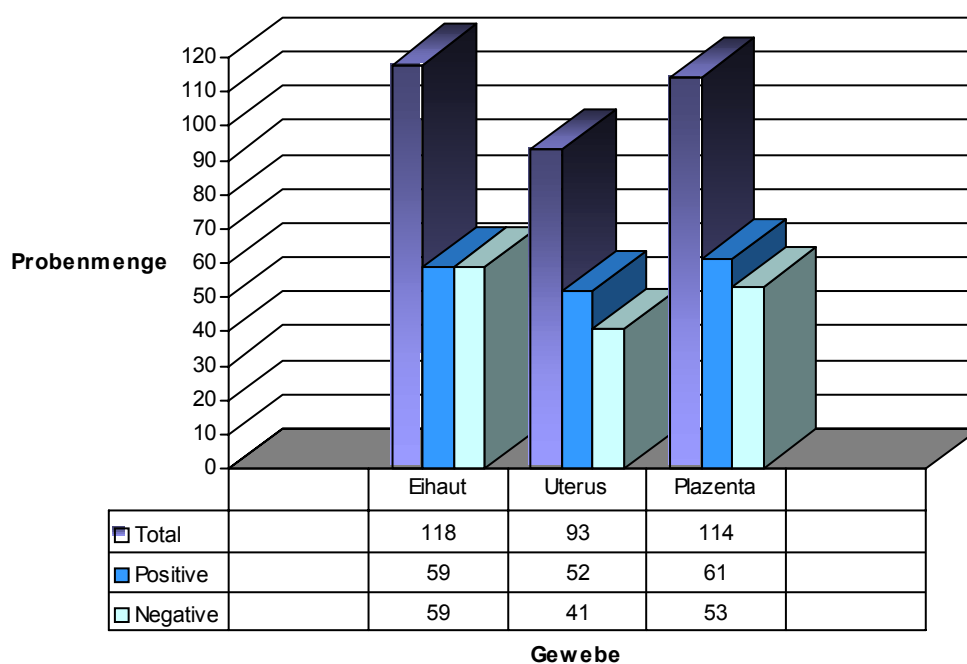
## 5. Ergebnisse

### 5.1. UTR-PCR der Patientenproben

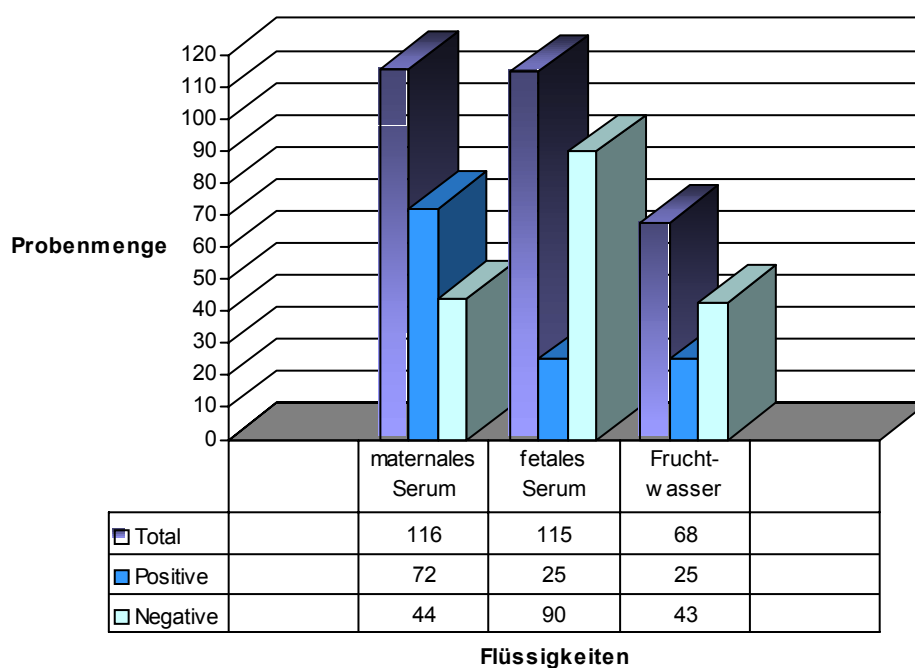
Die Ergebnisse der nested-PCR-Reaktionen von 624 Proben – **Probenart:** Eihaut, Uterus, Plazenta, Maternales Serum, Neonatales Serum und Fruchtwasser - (268 Patienten) sind in tabellarischer Zusammenstellung wiedergegeben (Tabelle 5.1):

**Tabelle 5.1.: Statistik: Ergebnis der UTR-PCR.**

Bezeichnung	Probenart	Anzahl	Positive UTR-PCR	Negative UTR-PCR	Anteil an Gesamt
<b>Rot</b>	Eihaut	118/624	59 (50.00%)	59 (50.00%)	18.91 %
<b>Gelb</b>	Uterus	93/624	52 (55.91%)	41 (44.08%)	14.90 %
<b>Grün</b>	Plazenta	114/624	61 (53.50%)	53 (46.50%)	18.26 %
<b>MS</b>	Maternales Serum	116/624	72 (62,07%)	44 (37.93%)	18.58 %
<b>NS</b>	Neonatales Serum	115/624	25 (21.74%)	90 (78.26%)	18.42 %
<b>FW</b>	Fruchtwasser	68/624	25 (36.76%)	43 (63,24%)	10.90 %
$\Sigma$			<b>294</b>	<b>330</b>	



**Abb. 5.1.: Ergebnisse TTV-UTR-PCR der Gewebe.**



**Abb. 5.2: Ergebnisse TTV-UTR-PCR der Körperflüssigkeiten.**

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde nach einer Methode von Okamoto et. al (1999), als eine nested-PCR mit je 35 Zyklen (1.) und 25 Zyklen (2.) durchgeführt.

Das Produkt der 1. PCR hat eine Größe von 142 bp, das der zweiten PCR von 109 bp.

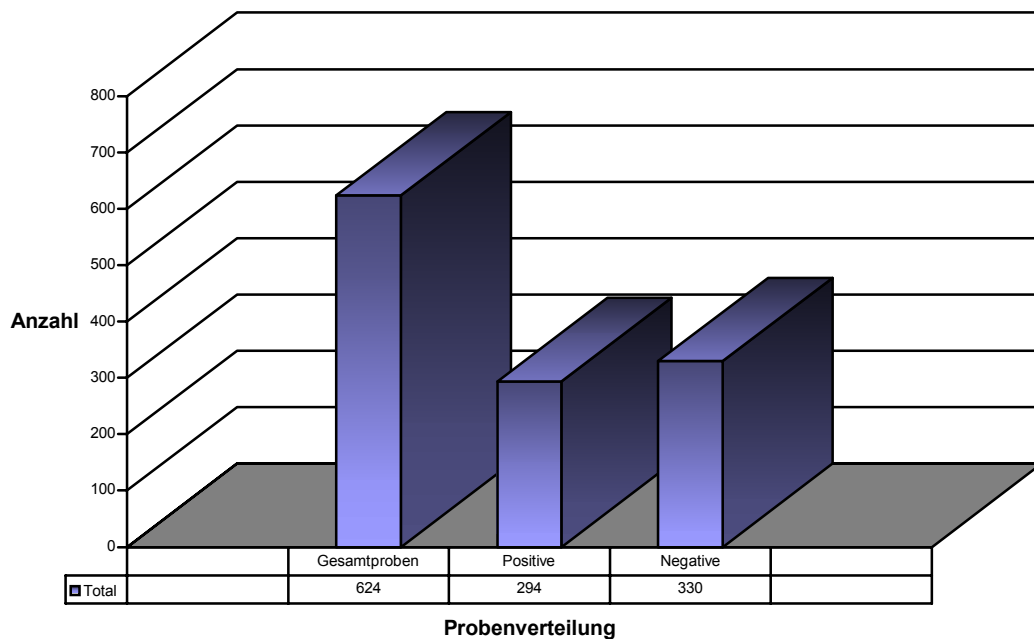


**Abb. 5.3.: Ergebnisse UTR-PCR.** Pat. 49-52. Das nachzuweisende Produkt der nested-PCR hat eine Größe von 109 kb. Positiv: 49G,49MS,49FW,50R,50MS,51GR,51MS,52NS  
Negativ: 49R,49GR,49NS,50GR,50NS,50FW,51R,51NS,52MS. Pfeil markiert Höhe bei 109 bp.

Die PCR-Untersuchungen ergaben einen hohen Durchseuchungsgrad der Allgemeinbevölkerung im mitteldeutschen Raum.

Gesamtpositive:                      294/624    =    **47.11 %**

Gesamtnegative:                    330/624    =    **52.89 %**



**Abb. 5.4.: Ergebnisse Gesamtproben Frauenklinik FSU Jena**

Total Positive:                      19/148     =   **12.84%**

Total Negative:                      37/148     =   **25.00%**

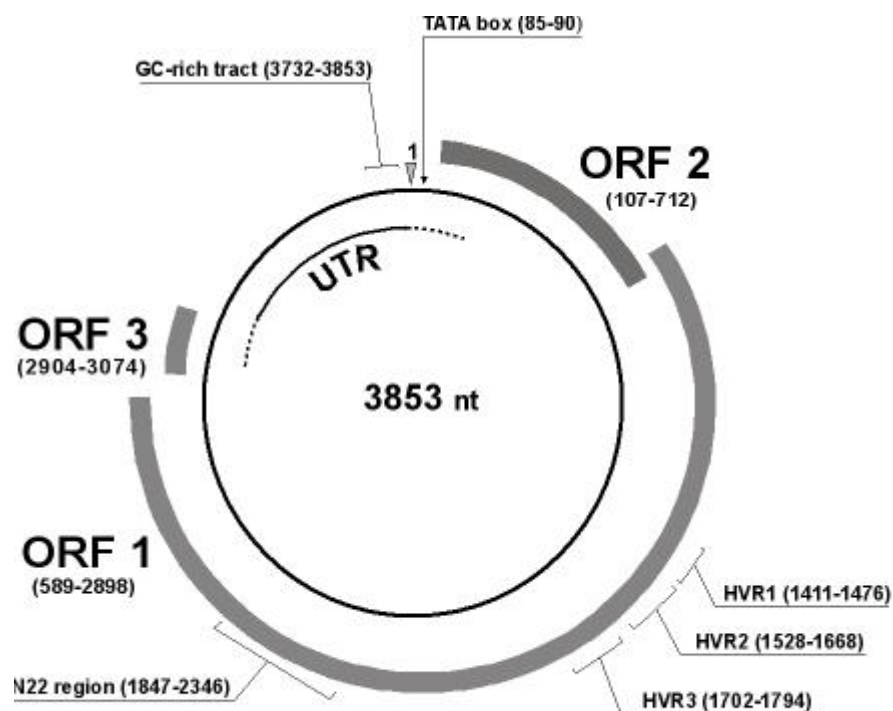
**75.00 %** der Patienten sind in mindestens einer Probenart TT-Virus positiv, dies entspricht **111/148** Frauen. Bei dieser Größenangabe wurde davon ausgegangen, dass bei manchen Patienteneinheiten nur eine der maximal sechs möglichen Gewebearten positiv getestet sein konnte und die übrigen Gewebe/Flüssigkeiten der gleichen Patientin negativ waren. Patienten-paarergebnisse beziehen sich also auf unterschiedliche Gewebe der Mutter und des korrespondierenden Neugeborenen.

## 5.2 Ergebnisse der Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden Probenmaterialien ausgewählt, die ausschließlich positiv getestet wurden, d.h. das Probengut der untersuchten Patienten wurde in drei Kategorien des Interesses für die weitergehenden Schritte separiert.

1. Patienten, deren testbare vorhandene Gewebe und Flüssigkeiten komplett TT-Virus positiv waren.
2. Patienten, deren testbare vorhandene Gewebe und Flüssigkeiten komplett TT-Virus negativ waren.
3. Patienten, deren testbare vorhandene Gewebe und Flüssigkeiten partiell TT-Virus positiv und/oder negativ waren.

Für die Sequenzierung wurden die unter 1. genannten Produkte stellvertretend ausgewählt.



**Abb. 5.5.: TTV-Genom.** Darstellung der offenen Leserahmen (ORF 1-3), der N22-Region, der hypervariablen Regionen und der GC-reichen Region innerhalb der nichttranslatierten Region (UTR)

Alle Teilsequenzen der untranslatierten Region (UTR) des TT-Virus stellen sich recht konserviert dar, obwohl es untereinander regionabhängig zu deutlichen Unterschieden kommen kann. Als Referenzsequenz dient die untranslatierte Region des TTV-Isolats TA278, welches als Grundlage für die PCR-Primer und die Detektion benutzt wurde (Okamoto et al. 1999). Wie aus der Grafik ersichtlich wird, konnte mit den UTR-A-Primern (siehe Tabelle 4.2., S. 28) eindeutig die nicht-translatierte Region des Virus nachgewiesen und anhand einzelner Sequenzvergleiche bewiesen werden, dass es während des Aufarbeitungs- und des PCR-Nachweisschrittes *nicht* zu Kontaminationen zwischen den einzelnen Patientenmaterialien gekommen war.



### 5.3 Alignment von 41 Sequenzen aus UTR-PCR Nachweis

Im Folgenden sind die Divergenzen der einzelnen Sequenzen zur Referenzsequenz TA278 dargestellt.

TA278	5'	TTCGGTGTGT	AAACTCACCT	TC-GGCACCC	GCCCTCGGGA	CGCGGAG-AT	CTTCCCTCCG
3GR	5'	TGCGGTGTGT	CA-CTCA-C-	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGT	CGCTCGGAG	CT-CC-TCCG
4G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CG-TCGG-AT	GCCCTGTCCG
4GR	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTCGAG-T	GGTCCGTCCG
4MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CGCTCCTCCG
5G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCTG-AT	CT-CCCTCCG
5GR	5'	TTCGGTGTGT	CAG-TCACCT	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGC-G-AT	CT-CCCTCCG
5MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCTG-AT	CT-CCCTCCG
11MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGTAGAAT	CT-CCCTCCG
11NS	5'	TATGGTGTGT	AA-CTCAC-T	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CGCTCCTCCG
15G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-T	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGAG-AT	CA-CCCTCCG
15GR	5'	TGCGGTGTGT	TT-CAA-T	ACGGCACC-	GCCCTCGGGT	AGCGGAT-AT	CA-CC-TCCG
15MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CGTCC-TCCG
15NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CGCTCCTCTC
16GR	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGAG-AT	C-ACCCTCCG
16MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-TCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGGG-AT	CTGCTCTCCG
16FW	5'	TGCGGTGTGT	AA-TCAC-T	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTCGACTG	CT-C-CTCCG
23GR	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGGG-AT	C-ACCCTCCG
23MS	5'	TTCGGTGTGT	AA-TCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGGG-AT	CA-CCCTCCG
24G	5'	TG-GGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGC-GAGGAT	CT-CCCTCCG
24GR	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGC-GAGGAT	C-TCCCTCCG
24MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-T	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTCAGGAT	CTGCCGTCCG
33MS	5'	TGCGGTGTGT	CA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGT	CGCGTCG-AT	CTGATCTCCG
33NS	5'	TGCGGTGTGT	CA-CTCACCT	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGT	CGCGGAG-AT	CTTCCGTCCG
47GR	5'	TGC-GTGTGT	AA-CTCAC-	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTCGG-AT	CTTCC-TCCG
47NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTCGG-AT	CT-CC-TCCG
66GR	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CGCTCCTCCG
71G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCGG-AT	CA-CCCTCCG
71GR	5'	-GCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCGG-AT	CC-CC-TC
71MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCGG-AT	CA-CCCTCCG
71NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCGG-AT	CA-CCCTCCG
87MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	CCCAGAAC	GCCCTCGGGA	CGCGGGG-AT	CA-CCCTCCG
87NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGGG-AT	CA-CCCTCCG
107GR	5'	TG-GGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGGAATAT	---CCTCCG
120GR	5'	TGC-GTGTGT	AA-TCAC-T	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	C-C-GAGGAT	---TCCCTCCG
120MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-T	TC-GGCACC-	GCCCTCGGGA	CGC-GAGGAT	CT-CCCTCCG
123MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGC-GAGGAT	CT-CCCTCCG
128NS	5'	CTCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGC-GAGGAT	CA-CCCTCCG
133GR	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGC-GGAAT	CT-CCCTCCG
167G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CG-CTCC
167MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCTC-G-AT	CGCTCCTCCG
170FW	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCC	TC-CGGCACC-	GCCCTCGGGA	CGCGCGG-AT	CTTCCGTGGT

**Abb. 5.6.: Sequenzalignment TT-Eluat.** Die einzelnen Sequenzen wurden manuell aligned. Die Referenzsequenz TA278 ist synonym mit dem TTV-Genotyp 1a. Unterschiede zur Referenzsequenz sind rot unterlegt.

Fortsetzung des Sequenzvergleichs von S. 46:

<b>TA278</b>	<b>TGGCTTCACC</b>	<b>GCTGCGGACG</b>	<b>GGCGTGGAAA</b>	<b>ACTCAGCCAT</b>	<b>TCGGAAGTGC</b>	<b>ACTTA</b>	<b>3'</b>
3GR	TGCT-CCCT	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
4G	TGGCTTCAC	TCCGGGGACG	GGCAGTATAA	ACTCAGACAT	TCGGAAGTGG	ACTTA	3'
4GR	TCGCGATCTC	GCCGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
4MS	TGGCGTCTC-	GCCGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
5G	TGGCGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
5GR	TGGCTAT-TC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	-TCAGC-AAT	TCGGAAGTGC	A-TTA	3'
5MS	TGGCTATATC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
11MS	TGA-TTC---	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
11NS	TCGCGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15G	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15GR	TGGTGCTAGC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGTAAGTGC	ACTTA	3'
15MS	TCGCGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15NS	TCGCGATCTC	GCCGCGGACG	GGCGTAGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
16GR	TGG-TGCTGC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
16MS	TGCGTCCATC	GCCGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
16FW	T-CG-CGATC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	AGTCAGC-AAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
23GR	TGG-TGCTGC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
23MS	TGGCTGCTGC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
24G	TGGCGTTCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
24GR	TGGCGTCTC-	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
24MS	TGGTGTCCTC	GCTGCGAACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGAAGTGC	ACTTA	3'
33MS	TGCGGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
33NS	TGT-GTCT-C	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
47GR	TGGCTATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
47NS	TGGCTATCTC	TCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
66GR	TCGCGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71G	TGGTGCTGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71GR	TGGTGTTCTC	GTTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71MS	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71NS	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
87MS	TGGTGCTG-C	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
87NS	TGGTGCTG-C	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
107GR	TGG-TGATGC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
120GR	TGGCGTCT-C	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
120MS	TGGCGTC-TC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
123MS	TGGCGTTCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
128NS	TGGTGCTGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
133GR	-GGTGTCCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
167G	TCGCGCGATC	GCTGCGGACG	GGCGTAGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
167MS	TCGCG--ATC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
170FW	-G--TT-GTC	GCTGCGGACG	GGCGTGGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'

Abb. 5.7.: Sequenzalignment TT-Eluate. Unterschiede zur Referenzsequenz sind rot unterlegt.

## 5.4 Sequenzierung des TT-Virus Kompletogenoms

Die Primer sollten einen Genomabschnitt von 3353 nt nachweisen(1), dies konnte jedoch mit vorliegenden Eluaten nicht erfolgreich realisiert werden. Die Primer wurden einer Arbeit von Okamoto et al. 1999 entnommen.

Das zu erwartende Produkt beträgt nach der 1.PCR **3386 nt**, und nach der 2.PCR **3353 nt**. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, dass die in der oben genannten Publikation beschriebenen Primerpaare **NG 135** und **NG 136** nach unseren Erkenntnissen nicht für die Kompletgenomsequenzierung des TT-Virus geeignet sind, da sie nur einen Teil der TTV-Virustypen erfassen können. Aufgrund des in Abb. 5.8. gezeigten Alignments mit relevanten Sequenzunterschieden innerhalb der wichtigsten Genotypen des TT-Virus im Primerbindungsbereich wird dies deutlich.

		3'-GGTTTTACCGGCAAGGTCA	
		3'-GGCAAGGTCA	
<b>TA278</b>	<b>TCGCCATAGACTTCGGCCTCCACTTTACCTTGTA AAAACTACCAAAATGGCCGTTCCAGT</b>	3464	
CG	TCGCCATAGACTTCGGCCTCCACTTTACCTTGTA AAAACTACCAAAATGGCCGTTCCAGT		
BDH1	TCGCCATAGACTTCGGCCTCCACTTTACCTTGTA AAAACTACCAAAATGGCCGTTCCAGT		
Sanban	TTGCCATAA-CGCGGACCCGTTTTCCTTCCGGACTACAAAATGGCCGTTCCAGT		
S039	TCACCATAGCTTCGGCCTCCGTTTTCAGGCTTCCGGACTACAAAATGGCCGTTCCAGT		
CH65-1	TCGTAGCCGACCGCGACCCGTTTTCGGGGCCCCCGCGGGCTCTCG-GCCGTTTAAAT		
TNJ01	TCGCCGTAGCTTCGGCCTCCACTTTAGGCTTCCGGACTACCAAAATGGCCGTTTTCAGT		
	* * * * *		
<b>TA278</b>	<b>GACGTCACAGCCGCCATTTTAAGTAGCTGACGTCAAGGATTGACGTAAAGGTTAAAGGTC</b>	3524	
CG	GACGTCACAGCCGCCATTTTAAGTAGCTGACGTCAAGGATTGACGTAAAGGTTAAAGGTC		
BDH1	GACGTCACAGCCGCCATTTTAAGTAGCTGACGTCAAGGATTGACGTAAAGGTTAAAGGTC		
Sanban	GACGTCACGCGCCGCCATTTTAAGTAAGGCG-GAAGCAGCT--CGGCATATACAAAATGTC		
S039	GACITCAGCGCGGCCATTTTAATTAAGGCG-GAAGCAGCT--CGGCGTACATAAAATGGC		
CH65-1	GACGTCACGCGGCCGCCATTTTGTGATACGCGCGTCCCTCC--CGGCTTCCGTACAACGTC		
TNJ01	GACGTCACGCGGCCGCCATTTTA-GATTGGCGCAGAGGATCTGACGTCAAAGTTCAAAGGTC		
	*** ** * *		
	CTGCA-5' NG136		
	CTGCAGTGTCGGCG-5' NG135		

**Abb. 5.8.: Primerdefinition NG 135/NG 136.** Alignment ClustalV. Unterschiede zur Referenzsequenz TA278 sind grau unterlegt, Primersequenz NG136 gelb, Primersequenz NG135 grün unterlegt.

Dabei zeigte sich eindeutig, dass diese Primer bei bereits bekannten Virusisolaten nicht binden und daher nicht geeignet sind, das komplette Virusgenom nachzuweisen.

Durch das Auftreten nicht-identifizierbarer Banden in der Gelelektrophorese wurde das entsprechende Produkt direkt aus dem Gel aufgereinigt und ebenfalls sequenziert. Anhand der Sequenzen konnte gezeigt werden, dass mit den oben genannten Primerpaaren das humane Cadherin-Gen, anstelle des TTV-Komplettgenom nachgewiesen wurde, welches eine hohe Sequenzähnlichkeit mit den Primerpaaren aufweist (siehe Abb. 5.9).

```

10501 GTTTTAAACTTGACCCTGATGAAAATGTGAGCACTGTTAGCAGATGCCTATGGGAGAGGA
AAAGCGTATCTGAAAATGGTCCAGGACAGGAGGATGAAATGAGATCCCAGAGTCCTCACA
CCTGAATGAATTATACATGTGCCTTACCAGGTGAGTGGTCTTTTGAAGATAAAAACTCT
AGTCCCTTTAAACGTTTGCCCCTGGCGTTTCCTAAGTACGAAAAGGTTTTTAAGCTTCG
AACAGTCTCCTTTTCATGACTTTAACAGGATTCTGCCCCCTGAGGTGTAATTTTTTTGTTC
NG 134 5'AGTTTTCACGCGCCGTCGCGCAGC 3'
10801 TATTTTTCCTCCACGTACCTCCACAGC CAACATCACGAGGTGTAATTTTTTAATTTGATCAG
ACTGTTACCAAAAAACAACTGTCAGTTTTATTGAGATGGGAAAAATGTAAACCTATTTT
ATTACTTAAGACTTTATGGGGAGAGATTAGACACTGGAGGTTTTTAACAGAACGTGTATT
ATTAATGTTCAAAACACTGGGAATTACAAATGAGAAGAGTCTACAATAAATTAAGATTTT
11041 GAATTTGTACTTCTGCGGTGCCTGGTTTTTCTCCACAAACACCCCCGCCCTCCCCATGC

```

**Abb. 5.9: Humanes Cadherin-Gen.** Ausschnitt Genombereich 10501nt bis 11101nt. Sequenzhomogenitäten zum Primer NG134 sind gelb unterlegt.

Das Gen ist dafür verantwortlich, dass die Zellen im Körper zusammengehalten werden, es ist ein Adhäsionsgen, das für die Bildung von "Klebe-Proteinen" verantwortlich ist.

Wenn dieses Gen geschädigt ist, löst sich die Zelle aus dem Verband und beginnt, im Körper zu wandern. Dieser Mangel an Adhäsionskraft ist Voraussetzung für die Bildung von Metastasen. Die Gene für  $\beta$ -Catenin befinden sich auf Chromosom 3p21, APC auf Chromosom 5q21 und  $\alpha$ -Catenin auf Chromosom 5q31.

Das E-Cadherin Gen wurde auf Chromosom 16q24 lokalisiert, wo häufig Duplikationen nachweisbar sind, die offenbar zur Entstehung von papillären Nierenzellkarzinomen beitragen. Der Genort 5p14-15 von Cadherin-6 wird mit der Entstehung von verschiedenen Tumorarten in Zusammenhang gebracht.

Beim modifizierten Versuch sollten die Primer ein Produkt von 3247 nt nachweisen, bei Primer NG 134-A wurden gegenüber NG 134 vier Nukleotide verändert, um die Möglichkeit der Erfassung der spezifischen Subtypen **CH65-1** und **S039** zu erreichen.

			NG134-A 5'-AGTTTATGCCGCCCGTCCGCAGC-3'	
			NG134 5'-AGTTTTCACGCCCGTCCGCAGC-3'	
TA-278	5'	TAAGTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTTCACGCCCGTCCGCAGCGGTGAA	3'	
CG	5'	TAAGTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTTCACGCCCGTCCGCAGCGGTGAA	3'	
BDH-1	5'	TAACTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTTCACGCCCGTCCGCAGCGGTGAA	3'	
sanban	5'	TAACTAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTTCACGCCCGTCCGCAGCGAGGGA	3'	
S039	5'	TAAAGCACTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTTCACGCCCGTCCGCAGCGAGGGA	3'	
CH65-1	5'	TAACCAAGTGCACCTCCGAATGGCTGAGTTTATGCGGCCCGTCCGCAGCGGAGC	3'	
TJN01	5'	TAAAGAACAGCACTCCGAATGGCTGAGTTTTCACGCCCGTCCGCAGCGAGGAG	3'	
		*****		

**Abb. 5.10.: Primerdefinition NG 134-A.** Alignment ClustalV. Primer NG134-A (modifiziert) ist rot, Primer NG134 (alt) ist grün unterlegt. Die Divergenzen von Isolat CH65-1 und S039 zur Referenzsequenz sind gelb unterlegt.

## 5.5 Sequenzvergleiche Mutter-Kind TT-Virus Pat. 11, 15, 33, 47, 71, 87

11MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TC-GGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGTAGAATC	T-CCGTGCG
11NS	5'	TATGGTGTGT	AA-CTCAC-T	TC-GGCACCG	CCCTCGGGAC	GC-TGG-ATC	GCTCCTCCG
15G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-T	TC-GGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGCAG-ATC	A--CCTCCG
15GR	5'	TGCGGTGTGT	TT-CAA-T	TCGGCACCG	CCCTCGGGTA	GCGCAT-ATC	A-CC-TCCG
15MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCTC-G-ATC	GTCC-TCCG
15NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCTC-G-ATC	GCTCCTCFC
33MS	5'	TGCGGTGTGT	CA-CTCAC-	TCCGGCACCG	CCCTCGGGTC	GCGTCG-ATC	TGATCTCCG
33NS	5'	TGCGGTGTGT	CA-CTCACCT	TC-GGCACCG	CCCTCGGGTC	GCGCAG-ATC	CTCC-TCCG
47GR	5'	TGCG-TGTGT	AA-CTCAC--	TCCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCTCGG-ATC	CTCC-TCCG
47NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC--	TCCG-CACCG	CCCTCGGGAC	GCTCGG-ATC	C-CC-TCCG
71G	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TCCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGCGG-ATC	A-CCCTCCG
71GR	5'	-GCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TCCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGCGG-ATC	C-CC-FC
71MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TCCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGCGG-ATC	A-CCCTCCG
71NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCAC-	TCCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGCGG-ATC	A-CCCTCCG
87MS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	CCCAGAACCG	CCCTCGGGAC	GCGGGG-ATC	A-CCCTCCG
87NS	5'	TGCGGTGTGT	AA-CTCACCT	TCCGGCACCG	CCCTCGGGAC	GCGGGG-ATC	A-CCCTCCG

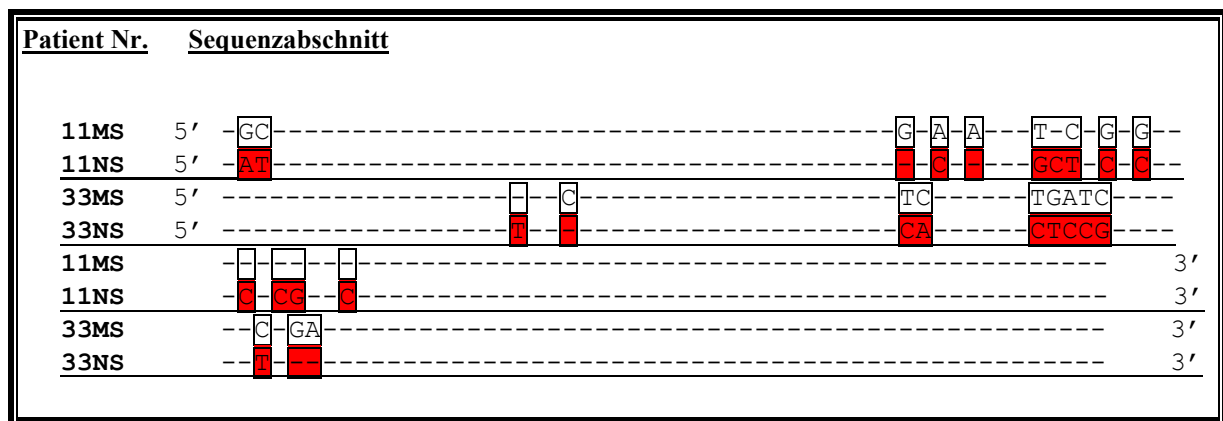
  

11MS	T-G--AT-TC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
11NS	TGCGGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15G	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15GR	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15MS	TGCGGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
15NS	TGCGGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
33MS	TGCGGATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
33NS	TGTG--TCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
47GR	TGGCTATCTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
47NS	TGGCTATCTC	TCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71G	TGGTGCTGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71GR	TGGTGCTGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	A-TCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71MS	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
71NS	TGGTGATGTC	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
87MS	TGGTGCTG-C	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'
87NS	TGGTGCTG-C	GCTGCGGACG	GGCGTGAAA	ACTCAGCCAT	TCGGAAGTGC	ACTTA	3'

**Abb. 5.11.: Mutter-Kind-Sequenzvergleich.** Pat. 11, 15, 33 mit relevanten Divergenzen im Genom zwischen unterschiedlichen Kompartimenten bei Mutter und Kind.

Bei drei von den sechs gezeigten direkten Mutter/Kind Sequenzvergleichen (Pat.15MS,15NS, 47GR,47NS, 87MS,87NS) stellten sich nur geringe Unterschiede dar, die zum Beispiel durch Polymerasefehler verursacht sein können, Probenpaar 71MS/NS ist sogar absolut identisch. Hier kann man von *hoher Sequenzhomogenität* sprechen

Nur zwei Probenpaare (11MS, 11NS, 33MS, 33NS; Abb. 5.12) weisen deutlichere Unterschiede auf und lassen auf Unterschiede im Genom der Virussubtypen des TT-Virus bei Mutter und korrespondierendem Kind schließen.



**Abb. 5.12.:Mutter-Kind-Divergenzen.** Patient 11, 33 UTR-Region. Probenmaterial: Maternales und Neonatales Serum.

Somit kann eindeutig gezeigt werden, dass die Virusgenome in einem Teil der Fälle sehr zwischen Mutter und Kind differieren. Allerdings sind auch signifikante Divergenzen des Virusgenoms innerhalb eines Patienten (15G, 15GR, 15MS) in unterschiedlichen Organen bzw. Geweben vorhanden (Abb. 5.13).

Patient Nr.	Sequenzabschnitt
15G	5' GCGG TAA TC C-TT-GGC AC G AG A C
15GR	5' CGCC GTT AA -TAGGC- TA G AT A C
15MS	5' GCGG TAA TC CC-T CCG AC T G GT C
71G	5' T T A CT
71GR	5' C C TC
71MS	5' T A CT
71NS	5' T A CT
15G	G T A GT T G G G 3'
15GR	G T C AG T G G G 3'
15MS	C C A CT T G G G 3'
15NS	C C A CT C G G G 3'
71G	C G C G 3'
71GR	C C C G 3'
71MS	C G C G 3'
71NS	C G C G 3'

**Abb. 5.13.: Divergenzen innerhalb eines Patientenpaares.** Pat. 15,71. Probenmaterial: Uterus, Plazenta, Maternales und Neonatales Serum.

## 5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im vorliegenden Patientengut zeigte sich eine hohe Durchseuchung mitteleuropäischer schwangerer Frauen mit dem TT-Virus (**75.00 %, d.h. 111/148 Frauen**). Ebenfalls konnte in einigen Fällen eine intrauterine Infektion der korrespondierenden Neugeborenen mit dem TT-Virus nachgewiesen werden (**21.74%, d.h. 25/115 Neugeborenen**). Die anschließende Sequenzierung der Patientenproben (der untranslatierten Region (UTR)) ergab deutliche Heterogenitäten innerhalb eines vergleichsweise hoch konservierten Bereiches des TT-Virusgenoms. Das direkte Alignment der Mutter-Kind-Paar-Sequenzen zeigte in Einzelfällen ebenfalls auffällige Divergenzen im Genom.

## 6. Diskussion

### 6.1 Materno-fetale Transmission von Infektionserregern

Die Ausbreitung von Infektionserregern kann in eine horizontale und in eine vertikale Transmission unterteilt werden. Als horizontale Transmission wird die Übertragung von Infektionserregern zwischen Individuen einer Population bezeichnet. Formen der horizontalen Übertragung sind Vektor-, Kontakt-, parenterale-, fäkal-orale- sowie die aerogene Übertragung. Der Begriff der vertikalen Transmission beschreibt den Übertritt infektiösen Materials von infizierten Müttern auf ihre Kinder während der Schwangerschaft.

Der Fetus ist durch die Plazenta und Eihäute gut geschützt. Für antenatale und peripartale virale Infektionen des Feten bestehen zwei Hauptrouten. Die Plazenta oder die Eihäute werden hauptsächlich hämatogen infiziert, eine weitere Möglichkeit stellt der Zugang bei Durchbruch der maternofetalen Grenzschicht dar. Der Übergang von virushaltigem mütterlichem Blut auf das Kind als Folge der plazentaren Mikrotransfusion ist eine weitere Variante.

Der Geburtsapparat gliedert sich in verschiedene Kompartimente. Dabei gibt es deutliche Trennungen des blutversorgenden Systems und andererseits des Frucht-ernährenden Teils.

Die Nabelschnur versorgt über zwei Arterien, die venöses Blut leiten, und eine Vene, welche arterielles Blut enthält, die Frucht. Dieses System enthält *nur* kindliches Blut, welches über den Kontakt mit der mütterlichen Plazenta wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt wird. Die Plazenta besitzt zwei Anteile, einen mütterlichen- und einen kindlichen Teil. Beide Kompartimente sind durch eine Plazentaschranke geteilt (Lippert 1996). An dieser Stelle ergibt sich ein möglicher diaplazentarer Transmissionsweg durch eine Störung der Plazenta-blutschranke. Eine weitere Möglichkeit innerhalb des Geburtsapparates ist der enterische Mechanismus. Hierbei kommt es durch das Verschlucken des Fruchtwassers (Amnionflüssigkeit), welches von den Eihäuten, dem inneren Epithel der Fruchtblase, gebildet wird, zur möglichen Übertragung des Virus.

Natürlich ist auch die Geburt an sich eine potentiell weitere Möglichkeit, dass das TT-Virus in den Körperkreislauf des Kindes gelangt.



Der Fetus muss während der Geburt den Geburtskanal passieren, der aus den weichen Geburtswegen (Zervix, Vagina und Vulva) besteht. Die Infektion könnte durch den Kontakt der Haut und Schleimhaut des Kindes mit mütterlichem Blut oder Vaginalsekret während des Geburtsvorganges erfolgen.

## **6.2 Materno-fetale Transmission viraler Infektionen**

Röteln, Cytomegalie-Virus (CMV), Parvovirus, Coxsackievirus B und evtl. Varizella Zoster-Virus (VZV) gehören zu den gesicherten transplazentar vermittelten Infektionen. Bei VZV-infizierten Schwangeren wird in 25-50% der Fälle das Virus diaplazentar auf den Embryo übertragen (Wutzler 2002). Dadurch kann es zu konnatalen Varizellen kommen. Ein noch ungeklärtes Beispiel stellt die Herpesvirus-6-Infektion dar, für die eine hohe Durchseuchung in der Bevölkerung besteht, ähnlich der TTV-Infektion. Im Alter von 2 Jahren weisen 95% der Bevölkerung bereits Antikörper gegen HHV-6 auf.

Dabei spielt die ante- und peripartale Infektion eher eine geringere Rolle, ist aber eine nachgewiesene Möglichkeit (Gärtner et al. 2002). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass ähnlich der TTV-Infektion keine Krankheitssymptome nachweisbar sind. Die am häufigsten auftretende antepartale Virusinfektion (0,2-2% aller lebendgeborenen Kinder) mit vertikaler Übertragung von der Schwangeren auf den Fetus, stellt die HCMV-Infektion dar. Die Folge können Erkrankungen des ZNS, allgemeine Unterentwicklung und andere schwerste Behinderungen sein. Eine in der Schwangerschaft schwer verlaufende virale Erkrankung kann auch ohne fetoplazentare Infektion ein Auslöser für Aborte und vorzeitige Wehen sein (Schäfer 2000).

Abhängig vom Zeitpunkt der Infektion während der Schwangerschaft können schwerwiegende Wachstums- und geistige Entwicklungsretardierungen des Kindes bzw. ein frühzeitiger Abort die Folge von Virusinfektionen sein. Für HIV und HSV konnte eine erleichterte Diffusion durch die Eihäute nachgewiesen werden. Eine erleichterte Diffusion durch die Plazenta für CMV und Röteln liegt nahe.

Es kann auch für Viren wie Masern-Virus, Polio-Virus und lymphozytäres Choriomeningitis-Virus bei einer ausreichenden Viruslast im Verlauf der Virämie Bedeutung haben. Es würde fehlende oder geringe Entzündungsreaktionen der Plazenta bei Infektion des Feten erklären (Scholz et al. 2002).

Ein Beispiel für mögliche Fehleinschätzungen zeigt die maternofetale Übertragung mit HIV. Anfangs wurde von frühen antepartalen Infektionen ausgegangen, der Benefit der primären Kaiserschnittentbindung (Vermeidung von ca. 80% der zu erwartenden Neugeboreneninfektionen) wurde über zehn Jahre lang übersehen. Eine effiziente Prävention stellt die unter der Geburt vorgenommene antiretrovirale Prophylaxe bei HIV dar (Schäfer 2000).

Das zeigt, dass das genaue Studium der Transmissionswege eines Virus entscheidende Bedeutung für die therapeutischen Ansätze hat. Das Übertragungsrisiko des HIV-Virus ist bei Spontangeburt oder notfallmäßiger Sectio, gegenüber Sectio am wehenlosen Uterus erhöht. Bei einer Spontangeburt besteht zudem die Möglichkeit, dass virushaltiges Vaginalsekret oder mütterliches Blut in Körperöffnungen des Kindes gelangt. Im Unterschied zum Erwachsenen stellen beim Neugeborenen die Schleimhäute des Respirations- und Gastrointestinaltraktes keine Barriere für das HIV-Virus dar und der noch anazide Magen kann bei der Virusinaktivierung versagen.

Die höheren Transmissionsraten gestillter Kinder HIV-positiver Mütter beweisen, dass der oralen Aufnahme virushaltiger Flüssigkeiten bei der vertikalen Transmission eine erhebliche Bedeutung zukommt (Wolf et al., 2001).

**Tabelle 6.1.: Vertikale Transmission von HIV bei verschiedenen Geburtsmodi (Wolf et al.,2001).**

Geburtsmodus	Transmissionsrate
Spontangeburt	19 %
Vaginal-operative Geburt	29 %
Sekundäre Sektio	19 %
Primäre Sektio ohne AZT	6 %
Primäre Sektio + AZT	1-2 %

Die primäre Sektio reduziert das vertikale Transmissionsrisiko bei Patientinnen ohne antiretrovirale Therapie und bei Patientinnen unter AZT.

Es ist plausibel anzunehmen, dass die primäre Sektio nicht nur bei einer Behandlung mit AZT sondern grundsätzlich bei jeder Therapie mit nachweisbarer Virusreplikation von HIV das Risiko einer vertikalen Transmission weiter reduziert. In allen Fällen, insbesondere jedoch bei nachweisbarer Virusreplikation, soll möglichst terminnah vor Wehenbeginn eine primäre Sektio durchgeführt werden (Deutsch-Österreichische Empfehlungen zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft, Stand Mai 2003).

Eine erworbene Virusinfektion in der Schwangerschaft hat unterschiedliche Auswirkungen auf den Feten, abhängig vom Entwicklungsstadium zur Zeit der Infektion oder Schädigung.

**Pränatale** Infektionen führen zu gravierenden Schädigungen, besonders in der Frühschwangerschaft innerhalb der ersten 3 Monate.

In einem noch früheren Stadium (1.-2. SSW.) wird der heranwachsende Embryo besonders durch Strahlung und Infektionen bedroht, die nach einem Alles-oder-Nichts-Prinzip entweder zu einem Frühabort führen, oder ohne Folgen bleiben (**Blastopathien**). Bis zum Abschluß der Organogenese (ca. 8. Woche) können teratogene Substanzen/Infektionen multiple Missbildungen verursachen, welche man als **Embryopathien** bezeichnet. **Fetopathien** sind Schädigungen der Frucht nach Abschluß der Organogenese (Embryonalphase).

Sie sind ebenfalls hauptsächlich durch pränatal erworbene Infektionen bedingt. Weiterhin spielen pränatale Infektionen eine Rolle bei der Entstehung von Fehlgeburten (Abort). Beispielhaft kann hierbei die CMV- oder die Rötelninfektion angeführt werden. Bei der zuletzt genannten Infektion liegt die Ursache häufig in der diaplazentaren Transmission. Besonders bei einer Infektion des Kindes in den ersten 12 Wochen ist der Tod oder ein charakteristisches Missbildungssyndrom (Rötelnembryopathie) zu erwarten: Augen- und Innenohrschaden, Mikrozephalie, Herzfehler und Hepatosplenomegalie (Kia 1999).

### 6.3 Das TT-Virus und seine klinische Bedeutung

Die **unklare** Pathogenese von etwa 10 % der akuten oder chronischen Lebererkrankungen in der Kindheit und rund der Hälfte der Fälle von fulminantem Leberversagen bedingen prinzipiell weitergehende Untersuchungen.

Die o.g. 10 % sind nachweislich nicht durch Hepatitis A-G Viren oder andere bekannte infektiöse Agenzien, wie *Brucella abortus*, *Leptospiren* oder *Schistosoma haematobium* verursacht. Die beim Erstbeschreiber erwähnten Aminotransferasewert-Erhöhlungen im Zusammenhang mit dem TT-Virus führten zu der Annahme, dass das TT-Virus ein primär hepatotropes Virus sein könnte (Nishizawa et al. 1997).

Die zum Teil in Studien nachgewiesenen Transmissionsarten des TT-Virus umfassen die Möglichkeiten der fäkal/oralen Übertragung, der parenteralen, in utero und diaplazentaren Transmission, sowie über den Kontakt mit infektiösen Agenzien via Muttermilch oder ähnlichem. Eine aktuelle Arbeit von Maggi et al. (2003) beschreibt außerdem die Möglichkeit der respiratorischen Transmission.

Als die zwei häufigsten Varianten werden die enterische- und die parenterale Transmission angenommen. Dabei gilt es noch zu klären, ob das Virus durch die Plazenta in die fetale Zirkulation penetriert, oder den Neonaten postnatal via Muttermilch infiziert (Bendinelli et al. 2001). Die hohe Prävalenz des TT-Virus weltweit bei unterschiedlichen Individuen von Mensch bis Tier gilt als gesichert. Aktuelle Zahlen zeigen regionale Unterschiede im Vorkommen des Virus und der Quantität, aber deutlich sind Prävalenzraten von bis zu 100 % der untersuchten Patienten in Saudi Arabien (Prescott et al. 1998). Daher muss man von multiplen Wegen der Übertragung ausgehen. Das Virus verursacht rasch nachweisbare Virämien, die durch das Immunsystem nicht nachhaltig verhindert werden können (Bendinelli et al. 2001). Ohne, dass daraus in den meisten Fällen eine klinische Symptomatik entsteht, also eine inapparente Infektion vorliegt, können hohe Viruslasten nachgewiesen werden.

Orte der Replikation und die Mechanismen sind ebenso unklar. Man geht von einer Persistenz in lymphoiden Zellen aus. Es wird vermutet, dass der Vorgang der Replikation in den Zellkernen in Abhängigkeit von zellulären Proteinen stattfindet. Die fertigen Viruspartikel werden im Körper durch Zelllyse freigesetzt und erweisen sich gegenüber physikalisch-chemischen Einflüssen als sehr resistent (Cheng et al.2000). Von Okamoto et al. (2001) wird angenommen, dass TTV in der Leber repliziert. Die Infektion mit dem TT-Virus verläuft normalerweise chronisch und ist durch eine lang andauernde Virämie im Blut charakterisiert.

Die über lange Zeiträume bestehende Persistenz in Zellen des menschlichen Körpers ist beschrieben (Matsumoto et al.1999). Es ist derzeit jedoch noch unklar, ob TTV in die Wirtszell-DNA integriert wird oder sich als Episom verhält. Der initiale Infektionsort ist noch unklar, ebenso wie dieser dann auch zur Verbreitung und Ausschleusung in die Blutbahn beiträgt. In aktuellen Arbeiten werden proliferierende hämatopoetische Zellen als eine mögliche Quelle der Übertragung beschrieben, da unter myelosuppressiver Therapie mit Cyclophosphamid die Virämie nicht mehr nachweisbar war (Kanda et al. 1999).

Da es eine große Anzahl von antiviralen Antikörpern innerhalb von TTV-infizierten Personen gibt, welche nicht in der Lage sind, das Virus in der Mehrzahl der Fälle zu eradizieren und weil die antivirale Immunität nicht ausreicht (bzw. vorhanden ist), um Superinfektionen mit anderen heterologen Subtypen zu verhindern (Bendinelli et al.2001), geht man heute von einer erheblichen Fähigkeit des Virus zur Evolution innerhalb eines Wirtes aus.

Mit zunehmendem Alter steigt die Rate der Durchseuchung an (Gerner et al. 2000). Die deutliche Sequenzdivergenz in Mutter-Kind-Paaren stellt die Mutter als häufige primäre Infektionsquelle in Frage. Aus dieser Erkenntnis resultiert die Annahme, dass die Übertragung hauptsächlich auf non-parenteralem Wege beruhen dürfte. Hierbei handelt es sich um zunehmende Kontaktereignisse und man schließt wiederum daraus, dass die in utero oder diaplazentare Übertragung sehr viel geringer ist und wurde sogar als unbedeutend dargestellt (Sugiyama et al. 2001).

Die wahrscheinlich effektivste Methode der Transmission ist die enterische. Das TT-Virus konnte in der Muttermilch infizierter Frauen nachgewiesen werden. Die anschließende Inokulation des infektiösen Materials während der Nahrungsaufnahme könnte eine mögliche Erklärung für den sehr starken Anstieg der Nachweisraten in den ersten Lebenswochen sein (Saback et al. 1999).

Die horizontale Transmission ist wie beschrieben durchaus effektiv, die Möglichkeiten des vertikalen Weges noch ungeklärt. In früheren Arbeiten wurde diese Übertragungsvariante untersucht und die Ergebnisse stellten sich sehr different dar. Man konnte in verschiedenen Mutter-Kind-Paaren unmittelbar postpartum eine hohe Sequenzhomologie aufzeigen, die es sehr wahrscheinlich macht, dass das Virus direkt von der Mutter auf den kindlichen Organismus übergegangen war und stabil persistierte (Gerner et al. 2000).

In anderen Paaren zeigten sich relative Sequenzunterschiede mit noch insgesamt hoher Ähnlichkeit zum Virusgenom der Mutter, so dass die Thematik der Evolution im Raume steht, die für persistenzfähige Virusarten ein wichtiges Charakteristikum darstellt.

Die vertikale, also materno-fetale Transmission wird heute als ein möglicher, aber noch nicht gesicherter Vorgang betrachtet, da Paare mit einem genetischen Link nachgewiesen wurden.

Außerdem stellt sich zwangsläufig die Frage, wenn Kontaminationen bei der Probenentnahme und der Bearbeitung nicht aufgetreten waren, wie konnte es anders möglich sein, als durch die eigene Mutter in Kontakt mit dem Virus gekommen zu sein. Dies wird durch die Ergebnisse der UTR-A-PCR Nachweismethode für das TT-Virus und deren Sequenzvergleiche deutlich. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in dem vorliegenden Untersuchungsmaterial eine materno-fetale Transmission des TT-Virus stattgefunden hat.

#### **6.4      Zu Vorkommen und Nachweis des TT-Virus in materno-fetalen Kompartimenten**

Zur Fragestellung der vertikalen Transmission des TT-Virus können Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des PCR-Nachweises in den verschiedenen Geweben gezogen werden.

Interessant ist, dass es deutliche Unterschiede in den Detektionsraten zwischen den Geweben der Mutter und denen des Kindes gibt.

Während natürliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gewebetypen zu erwarten waren, die sich von maximal **62,07%** beim maternalen Serum und **50 %** bei den Eihautgeweben, sowie **55,91%** beim Uterusgewebe und **53,50%** der Plazentamaterialien erstreckten, sind die niedrigeren Werte beim neonatalen Serum mit **21,74%** und **36,76%** beim Fruchtwasser auffällig. Diese Ergebnisunterschiede waren unabhängig von den eluierten DNA-Mengen.

Anhand dieser Ergebnisse kann gezeigt werden, dass **21,74%** Positive bei den neonatalen Seren für eine effektive Transmission in utero sprechen. Fruchtwasser, welches vom Fetus im Mutterleib verschluckt wird, konnte in mehr als einem Drittel der Proben als positiv für das TT-Virus getestet werden.

Somit scheint die enterische Übertragung im Geburtsapparat auch in der vorliegenden Studie von großer Bedeutung zu sein. Von den getesteten Plazentageweben waren über die Hälfte als positiv getestet worden, so dass ebenfalls eine effektive diaplazentare Transmission existiert. Die vaginale Sekretion kann in dem vorliegenden Probenmaterial nahezu ausgeschlossen werden, wenn man sich auf die o.g. Aussagen über den Geburtsvorgang, nämlich die **primäre Sectio** beruft. Alle untersuchten Neugeborenen kamen auf diesem Wege zur Welt. Die Gründe dafür, dass keine Spontangeburt durchgeführt werden konnte sind verschieden (Tabelle 6.2).

**Tabelle 6.2.: häufigste Diagnosen/Indikationen zur primären Sectio.** Quelle Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe FSU Jena (1995-1997). \* Cardiotokogramm

Diagnose/Indikation	Fälle
EPH-Gestose	4
Pathologisches CTG*	17
Akuter fetaler Distress	6
pH-Abfall	15

Wenn man an dieser Stelle die Möglichkeit der zu niedrigen Detektion des TT-Virus im vorliegenden Probematerial mit einbezieht, dann verfestigt sich nur die Annahme der erfolgreichen vertikalen Transmission.

Im Rahmen der Geburt kann es zum vorzeitigen Blasensprung kommen. Dabei kann es über virushaltiges Material in Dezidua oder Zervix zur peripartalen Infektion kommen (Schäfer 2000). Bisher gelten die Übergangswege nur in einigen Fällen als gesichert. Die direkte Infektion könnte über den Erregernachweis in den plazentaren Villi oder Eihäuten gesichert werden, ebenfalls durch den serologischen Nachweis von fetalem IgM. Eine weitere Nachweismöglichkeit ist die Untersuchung von Fruchtwasserpunktaten mittels PCR-Methoden, um eine vertikale Infektion direkt nachzuweisen. Es gibt darüber hinaus weitere bisher beschriebene Wege, wie z.B. via Muttermilch, Speichel und nasal (Ross et al. 1999).

Der Anstieg der als TTV-positiv getesteten Neugeborenen im Verlauf des ersten Lebensjahres fällt moderat aus, so dass man von der vertikalen Transmission als einem primären Übertragungsweg innerhalb des beschriebenen Zeitabschnittes ausgehen kann (Gerner et al. 2000).

In dem vorliegenden Patientenmaterial befinden sich Teile des Geburtsapparates, wie Uterus-, Plazenta-, Eihautgewebe, außerdem Seren des Foeten und der Mutter, sowie das von der Mutter gebildete Fruchtwasser. Da die Plazenta über die Nabelschnurgefäße mit dem Kind verbunden ist, konnte auf Materialien für nahezu alle möglichen Übertragungswege innerhalb der Geburtskompartimente zurückgegriffen werden.

Dabei zeigte sich eine hohe Durchseuchung der Patientenproben. **75.00 %** der Patienten sind in mindestens einer Probenart TT-Virus positiv, dies entspricht **111/148** Frauen. Bei den Ergebnissen ist die im Gegensatz zu den anderen biologischen Materialien relativ niedrige TTV-Prävalenz bei den neonatalen Seren (**21.74%**) auffällig. In etwa **1/5** der Geburten wurde das Virus von der Mutter auf das Kind übertragen. Es beweist die Rolle der vertikalen Transmission als potenter Übertragungsmodus. Fruchtwasserproben können ebenfalls zur Unterstützung dieser Hypothese herangezogen werden.



Hierbei zeigte sich, dass **36.76%** der Proben TTV-positiv waren, ein weiterer Hinweis für die vertikale Übertragung von Virusmaterial. Außerdem konnte, anhand der Mutter-Kind-Sequenzalignments, in einigen Fällen eine große Identität bzw. nur geringe Divergenzen innerhalb des TT-Virusgenoms von Mutter und Kind nachgewiesen werden.

**Methodisch** wäre in diesem Zusammenhang zu hinterfragen:

wenn es im Rahmen der Schnittenbindung zur Kontamination zwischen mütterlichem- und kindlichem Kreislaufes gekommen wäre, könnten die untersuchten neonatalen Seren (NS) im Prinzip auch *falsch negativ* getestet worden sein (da Blutproben des Neugeborenen zu einem späteren Zeitpunkt nicht erneut auf eine Infektion mit dem TT-Virus untersucht wurden).

Um Kontaminationen bei der Probenentnahme und der Bearbeitung zu vermeiden, wurde auf steriles Arbeiten und Umfeld Wert gelegt. Um Kontaminationen bei Grenzbefunden auszuschließen (z.B. 50% Positiv, 50% Negativ innerhalb eines Patienten, schwache Banden in der Gelelektrophorese), wurden diese erneut getestet und bestätigt. Eine weitere Kontrollinstanz stellte die Sequenzierung dar.

Die PCR-Reaktion zum Nachweis des TT-Virus im Patientenmaterial wurde mittels einer neuen, viel sensitiveren Methode mit neuartigen Primerpaaren, die vornehmlich im untranslatierten Genombereich des TT-Virus binden durchgeführt. Die Detektionsraten konnten dadurch drastisch erhöht werden (Biagini et al. 2001).

Die UTR-Primer weisen eine sehr hohe Sensitivität in der Detektion des TTV-Genotyps 1 auf, könnten jedoch bei extrem großen Sequenzunterschieden versagen (Gerner et al. 2000).

## **6.5 TTV-Genomdivergenz und Virusvariabilität**

Bei der Betrachtung der einzelnen Sequenzpaare von Mutter und Kind gibt es offensichtliche Genomdivergenzen. Wie kann so etwas entstehen, wenn die Transmission vertikal erfolgte?

Das bei den korrespondierenden Kindern nachgewiesene Virus kann nur von der Mutter stammen, da der Fetus bis zur Geburt keinen Kontakt mit der Außenwelt hatte. Woraus resultieren die unterschiedlichen Virussequenzen? Eine Möglichkeit stellt die Evolution des Virus im Mutter- sowie im Kindesleib dar.

TTV hat die Fähigkeit sehr lange im Wirt zu persistieren, ein möglicher Grund dafür ist, (vergleichbar mit HBV), die schon sehr frühe (pränatal, postnatal) Exposition und resultierende Entstehung einer Persistenz (Matsumoto et al. 1999). Der Versuch, über 30 Monate mit 100mg Lamivudin, einem Nukleosidanalogen, die reverse Transkriptase des Virus zu hemmen, konnte nicht erfolgreich angewendet werden (Bendinelli et al. 2001).

Dies spricht für die erhebliche Resistenz des Virus gegenüber äußeren Einflüssen. Ein weiterer fördernder Aspekt ist die wahrscheinlich nur ungenügende Immunantwort bzw. die nicht effizient genug gebildeten Immuneffektoren (die die Infektion nicht kontrollieren können).

In einer Studie von Tsuda et al. (1999) wurden ganze TT-Viren aus Fäkalextrakten als Antigen eingesetzt, um anti-Ig-Präzipitation zu demonstrieren. Dabei waren anti-TTV-Antikörper vorhanden, wobei das Virus aber später im Plasma nicht mehr detektierbar war. Bei einem Patienten, der über einen längeren Zeitraum beobachtet werden konnte, waren anti-TTV-Antikörper über 4 Jahre lang vorhanden.

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass bei chronisch TTV-Infizierten, nicht aber bei kürzlich infizierten Patienten, eine große Menge an zirkulierendem TTV mit Immunglobulinen der Gruppe IgG Komplexe bildet (Nishizawa et al. 1999). Durch diese Eigenschaften ist auch die hochgradige Fähigkeit zur Variabilität bedingt, die auch in unserem Falle zur Evolution des Virus im Körper des Kindes oder der Mutter beigetragen haben könnte. In der Literatur sind ebenfalls Fälle von Koinfektionen mit multiplen Genotypen des Virus beschrieben. Dabei wurden Patienten über 5 Jahre untersucht, wobei sich zeigte, dass ein Drittel davon sehr differente Genomsequenzen aufwiesen und die Übrigen recht stabile Genomverhältnisse zeigten (Ball et al. 1999). Nun kann man diese Daten nicht direkt mit unserer Fragestellung nach der Evolution des Virus im Kindesleib gleichstellen, aber die Möglichkeit der Koinfektion mit diversen Genotypen der Mutter besteht.

Um diese Hypothese zu verifizieren und die Mutter-Kind-Sequenzen als multipel infiziert bezeichnen zu können, sollten weitere Bereiche des TTV-Genoms, wie die Open Reading Frames (ORF) der TTV-positiven Patientenproben sequenziert werden.

Die Fähigkeit von TT-Virus chronische Infektionen zu verursachen, gibt dem Immunsystem des Wirts die Möglichkeit, dauerhaft Evolutionsdruck auszuüben und somit genetische Variabilität zu erreichen (Prescott et al. 1999). Über das Ausmaß gibt es gegenteilige Angaben, es wird von starker und nur moderater (Ball et al. 1999) Veränderung des Virus während einer chronischen Infektion über 3-8 Jahren beim Menschen berichtet.

Die Versuche, das komplette Genom des Virus zu sequenzieren, stellten sich als äußerst schwierig dar, und es konnte in diesem Punkt keine optimale Methode zur Genomsequenzierung etabliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mittels definierter molekularbiologischer Methoden epidemiologische Aussagen zu tätigen. Ziel weiterer Untersuchungen sollte aber die Darstellung und Sequenzierung des kompletten Genoms sein. Auch mittels modifizierter Primersequenzen und ausführlichem Alignment der häufigsten TT-Virus Genotypen konnte keine der beschriebenen Methoden letztlich befriedigend ausgeführt werden. Eine mögliche Erklärung dieses Umstandes sind die hohen Genomdivergenzen und die Vielzahl von beschriebenen Geno/Subtypen des TT-Virus.

Die hohe Sequenzdivergenz innerhalb des nachgewiesenen Bereiches der nicht-translatierenden Region unter den Probenmaterialien ist ein Beleg für diese Aussage. Im Vergleich mit nahezu allen anderen Genotypen ist diese Region durch eine hohe Stabilität und Homogenität charakterisiert. Es konnten zum Teil Genomdivergenzen innerhalb dieses, vergleichsweise kleinen und stabilen Abschnittes des Virus aufgezeigt werden, die aber für die endgültige Klassifizierung nicht spezifisch, sondern hypervariabel waren.

Die Fähigkeit des Virus zur Evolution führt zur Schwierigkeit des Nachweises aufgrund der fehlerhaften Primerbindung. Damit kann die These verschiedener Autoren, die sich auf die potentiell zu niedrige Positivdetektion des TT-Virus bezieht, auch an dieser Stelle mit hoher Wahrscheinlichkeit bekräftigt werden.

Ein Beispiel dafür ist die erhebliche Sensitivitätssteigerung des Nachweises durch die in der vorliegenden Arbeit gewählten Primerpaare nach einer Arbeit von Okamoto et al. (1999), welche nach Konzentrierung auf eine stabile Region die Detektionsraten verbesserten. Nur *ein* beschriebener PCR-Assay erfasst alle bisher bekannten **16 Genotypen** mit Primern aus der UTR-Region (Okamoto et al. 1999), die zahlreichen anderen Methoden sind nur von unzureichender Sensitivität (Okamoto et al. 2000). Aufgrund bisheriger mangelnder klinischer Relevanz von TTV besteht ein nachlassendes Interesse kommerzieller Unternehmen zur Entwicklung adäquater Reagenzien und Diagnostikkits. Aufgrund der großen genetischen Variabilität ist die Wahl des geeigneten DNA-Segmentes, welches amplifiziert werden soll, entscheidend für die Sensitivität des Assay (Itoh et al. 1999, Leary et al. 1999).

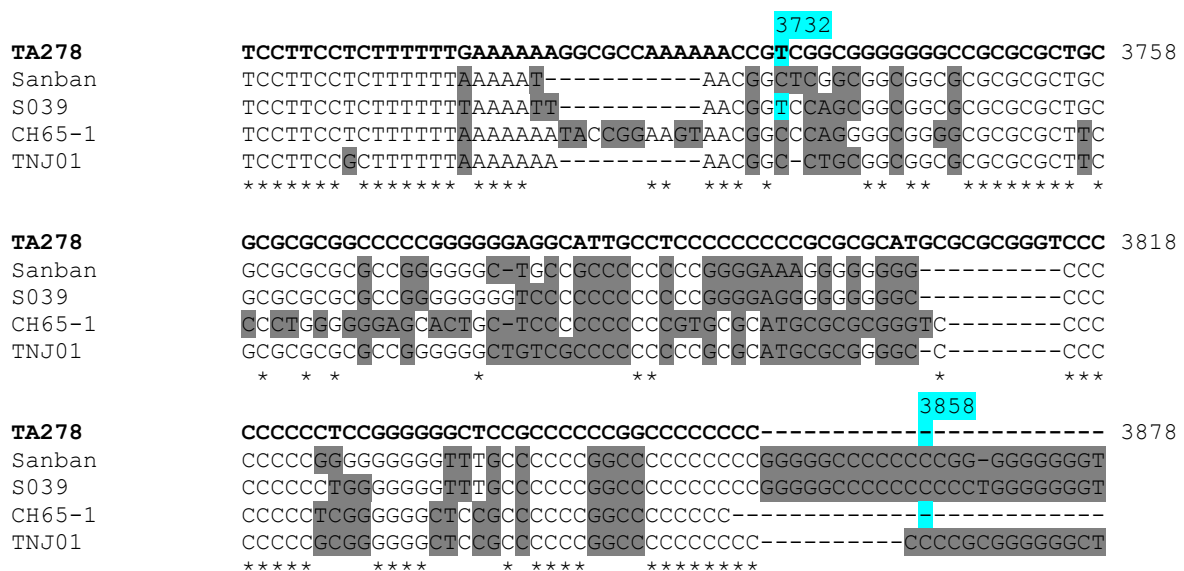
Der N22 Bereich in ORF1 wurde mit nested- sowie seminested PCR amplifiziert. Jedoch konnten dabei nur die **Genotypen 1-6** nachgewiesen werden, besonders dann, wenn der Virusgehalt in den Proben gering war (Okamoto et al. 1998, Nishizawa et al. 1997). Aufgrund der höheren Konservierung der UTR-Region ermöglichten die Primer, die in dieser Region binden, mit ausreichender Sensitivität den Nachweis von TT-Virus. Die niedrigsten, noch nachweisbaren DNA-Mengen liegen bei etwa  $10^2$  bis  $10^3$  Genomen/ml Plasma. Zur quantitativen Bestimmung des Virusgehalts im Plasma und anderen klinischen Proben werden end-point-dilution-PCR (Irving et al. 1999), kompetitive PCR-Assays und verschiedene real-time PCR Methoden (Morrica et al. 2000) benutzt. Im Allgemeinen sind die UTR-basierten Assays 10-100fach sensitiver, als die auf der ORF1- Region basierenden Methoden.

Alle bisher bekannten Genotypen und die weiteren Neubeschreibungen von Subtypen bestätigen die evolutionäre Fähigkeit von TTV. Darauf deuten andere Arbeiten ebenfalls hin, so dass die Effektivität der materno-fetalen Übertragung noch um einiges höher sein dürfte.

Im Rahmen der Sequenzierung ist zu erwähnen, dass die Sequenzierung eines DNA-Abschnitts mit einem hohen Gehalt der Basen Guanin und Cytosin, so genannte *GC-reiche Regionen*, rein technisch eine schwierigere Aufgabe sein kann. Der Grund liegt in der höheren Stabilität durch drei, anstelle von zwei H-Brücken in der Guanin-Cytosin-Bindung.

Diese benötigen bei der Denaturierung viel höhere Energien und bedürfen daher anderer Bedingungen im Protokoll. Es ist nicht zwangsläufig so, dass die Sequenzierung dieser Bereiche mit einer erhöhten Fehlerrate versehen ist, es ist jedoch eine aufwendigere Prozedur.

Diese Region, die zwischen 3732 und 3853 nt des TT-Virus-Genoms lokalisiert ist, also im Bereich der nicht-translatierten Region (~0-90 nt und 3134-3853 nt), komplettiert das zirkuläre Genom (siehe Abb. 6.1).



**Abb. 6.1.: Alignment GC-reiche Region.** Manuell, sowie mit Hilfe von ClustalV (Thompson et al., 1994) Alignment Bereich von 3698-3878 des TTV-Genom. Darstellung GC-reiche Region von 3732-3858.

Zur Fragestellung der Einteilung in bekannte Geno/Subtypen innerhalb des Patientengutes kann im vorliegenden Fall **keine** Aussage gemacht werden.

Das ist damit zu begründen, dass bei der Auswahl der Detektionsprimer (Okamoto et al. 1999) auf eine maximal mögliche Sensitivität des Nachweises des Virus in dem vorhandenen Probenmaterial fokussiert wurde und dabei Oligonukleotide benutzt wurden, die aktuellsten Literaturrecherchen entsprachen. Die Nukleotidsequenz des TT-Virus in der untranslatierten Region (UTR) ist höher konserviert, als die der codierenden Region, wie die N22 Region im offenen Leserahmen1 (ORF 1). Dies ist auch der Grund dafür, dass TTV-DNA sicherer mit Primern der stabilen UTR-Region detektiert wird, als mit denen, der N22 Region (Okamoto et al. 2000).

Dies hat zur Folge, dass zwar Genomunterschiede unter den verschiedenen Patientenproben vorhanden sind, um eine Typen-spezifische Sequenzierung mit Möglichkeit der Einteilung in verschiedene Virusgeno- und subtypen vorzunehmen, ist die UTR-Region jedoch aufgrund der Sequenzhomologie innerhalb der verschiedenen TT-Virustypen ungeeignet. Hier ergeben sich interessante Fragestellungen für zukünftige weitergehende Untersuchungen.

## 7. Schlußfolgerungen

Gemäß den vorgegebenen Zielen:

1. Erfassung epidemiologischer Daten zum Vorkommen des TT-Virus in verschiedenen materno-fetalen Kompartimenten und in neonatalen Seren,
2. Sequenzanalysen der TT-Virus positiv getesteten Untersuchungsmaterialien,
3. Aussagen zur materno-fetalen Transmission des TT-Virus.

ergeben sich zusammenfassend folgende Schlußfolgerungen:

Der nested-PCR-Nachweis der untranslatierten Region des TT-Virus zeigte hohe TTV-Prävalenzen in den vorliegenden Untersuchungsmaterialien der Mutter (**62,07%** Maternales Serum, **55,91%** Uterusgewebe). Die neonatalen Seren (**21,74%**) und die Fruchtwasser (**36,76%**) zeigten deutlich niedrigere Werte im Nachweis. Damit konnte gezeigt werden, dass bei klinisch gesunden Probanden eine hohe TT-Virus-Durchseuchung besteht. Außer den zum Teil vorhandenen Geburtskomplikationen, die zur primären Sectio caesarea führten, waren beim Probandenpool keine uns bekannten pathologischen Befunde vorhanden, so dass die TT-Virus Infektion bis dahin klinisch inapparent verlaufen war.

Die großen TTV-Prävalenzen unter den Proben der Mütter lässt auf effektive horizontale und vertikale Transmissionsmechanismen schließen, die nicht nur den nachgewiesenen potenten parenteralen Übertragungsweg beinhalten, sondern auch andere Formen. Durch diese Daten kann bestätigt werden, dass anhand der Wahl der geeigneten Primer (UTR-Region) deutlich höhere Prävalenzen in verschiedenen Geweben nachgewiesen und die bisherigen epidemiologischen Daten zum TT-Virus mittels anderer Nachweismethoden durchaus als zu niedrig angesehen werden können.

Die großen Divergenzen innerhalb der unterschiedlichen Geno- und Subtypen des TT-Virus stellten einen besonderen Aspekt bei der Sequenzierung der Probandenproben dar. Zur Klärung der offenen Fragen wurde die hochkonservierte UTR-Region des TT-Virus benutzt.

In diesem stabilen Abschnitt des TTV-Genoms konnten divergente Sequenzen gezeigt werden, dies bestätigt auch im vorliegenden Untersuchungsmaterial die Aussage der extremen Heterogenität des Virusgenoms. Diese evolutionär bedingten Genomdivergenzen zwischen den korrespondierenden Mutter-Kind-Paaren, die sich mit der Fähigkeit des Virus zur Persistenz erklären lassen, konnten auch im direkten Sequenzalignment *nachgewiesen* werden. Dabei zeigte sich bei nur **2** der untersuchten **6** Paare eine hohe Sequenzhomogenität zwischen der Mutter und dem Neugeborenen, während die anderen Probanden (Pat.Nr. 66,67) diverse eindeutige Unterschiede aufwiesen. Dadurch konnte in einzelnen Patientenproben das bei der leiblichen Mutter gefundene Virusgenom, als unterschiedlich zu dem des Neugeborenen angesehen werden.

Die TTV-Prävalenzen der neonatalen Seren, Eihäute und Fruchtwasser der Untersuchungsgruppe bewiesen die Fähigkeit des Virus zur vertikalen Transmission. Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass schon pränatal eine effektive Transmission und Persistenz des TT-Virus existiert. Diese Aussage wurde durch den chirurgischen Geburtsmechanismus (Sectio), der bei anderen Viren zur peripartalen Transmissionsprophylaxe gezielt angewendet wird und auch in dieser Studie ausschließlich zur Anwendung kam, nur bestätigt. Der Stellenwert der materno-fetalen Übertragung wird immer noch, im Vergleich zur horizontalen Transmission des TT-Virus, unterschätzt, ist aber wie gezeigt eine ernstzunehmende Variante. Wenn wir eine Multiinfektion zum Zeitpunkt der Geburt als vernachlässigbar ansehen (Sectio), ist nach den gezeigten Ergebnissen der Sequenzierung nur eine Evolution des Virus innerhalb der Körperzellen während einer chronischen Infektion als Ursache wahrscheinlich.

Abschließend kann festgestellt werden, dass in dieser Studie neben dem Nachweis der hohen Prävalenz des TT-Virus unter schwangeren Frauen und deren Neugeborenen der Beweis einer vertikalen, maternofetalen Transmission als sehr wahrscheinliche und potente Übertragungsmöglichkeit des TT-Virus erbracht werden konnte. Interessant für die Zukunft, weil seit der Entdeckung 1997 noch nicht erfassbar, sind die Langzeitauswirkungen einer chronischen TT-Virus Infektion. Durch die Erkenntnisse über die Fähigkeit des Virus Immunkomplexe zu bilden, ist es unwahrscheinlich, dass gerade Organe, wie die Niere und andere Orte der Immunkomplexdeposition ohne jegliche pathologische Konsequenzen verbleiben (Bendinelli et al. 2001).



Unzweifelhaft ist, dass die hohe weltweite Durchseuchung mit dem TT-Virus ohne oder mit nur geringen klinischen Auswirkungen sehr fraglich erscheint. Daher liegt es auf der Hand, mehr über die Übertragungswege und potenziellen Humanpathologien zu erfahren. Es erscheint außerdem zwingend nötig, weitere Untersuchungen durchzuführen, um neue Erkenntnisse über die wirkliche klinische Bedeutung der TT-Virus Infektion zu erlangen.

## 8. Literatur

- 1 **Abe K., T.Inami, K.Asano, C.Miyoshi.** 1999. TT-Virus infection is widespread in the general population from different geographic regions. *J Clin Microbiol*, 37(8):2703-2705.
- 2 **Abe K., T.Inami, K.Ishikawa, S.Nakamura.** 2000. TT-Virus infection in nonhuman primates and characterization of the viral genome: identification of simian TT-Virus isolates. *J Virol*, 74: 1549-1553.
- 3 **Akahane Y., M.Sakamoto, Y.Miyazaki, S.Okada.** 1999. Effect of interferon on a nonenveloped DNA Virus ( TT-Virus ) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *J Med Virol*, 58:196-200.
- 4 **Almerighi C., M.Artini, E.Cariani, M.Fulco.**  
Prevalence and genomic variability of TT-Virus in italian cryptogenic hepatitis patients and healthy blood donors. Univ. of Cagliari, Italy
- 5 **Ball J.K., R.Curran, S.Berridge, A.M.Grabowska.** 1999. TT-Virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol*, 80,1759-1768
- 6 **Bassami M., D.Berryman, G.E.Wilcox, S.R.Raidal.** 1998. Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus. *Virology* 249:453-459
- 7 **Bassit L., K.Takei, A.S.Nishiya.** 2000. High prevalence of TT-Virus infection in three different groups from brazil. University of Sao Paulo
- 8 **Bendinelli M., M.Pistello , F.Maggi , C.Fornai.** Jan.2001. Molecular Properties, Biology and clinical implications of TT-Virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev*, 98-110
- 9 **Berg T., E.Schreier, H.G.Heuft, M.Hohne.** 1999. Occurance of a novel DNA virus ( TTV ) infection in patients with liver diseases and it's frequency in blood donors. *J.Med Virol*, 59:117-121
- 10 **Biagini P., P.Gallian, H.Attoui, J.F.Cantaloube.** 2001. Comparison of systems performance for TT-Virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. *J Clin Virol* 22,:91-99

- 11 **Biagini P., P.Gallian, J.F.Cantaloube, De Mico.** 1998. Presence of TT-Virus in french blood donors and intravenous drug users. *J Hepatol*, 29:684-685
- 12 **Cacoub P., P.Halfon, L.Musset.** 1999. Transfusion-transmitted virus and mixed cryoglobulinemia. *Ann Intern Med*, 130:451-452
- 13 **Caruthers MH, Beaucage SL, Becker C, Matteucci M.**1983. Desoxyoligo-nucleotide synthesis via the phosphoramidite method. *Gene Amplif Anal.*;3:1-26
- 14 **Chamberland M., H.Alter, M.Busch.** 2001. Emerging infectious disease issues in blood safety. *Emerg Infect Dis*, 7:552-553
- 15 **Chan P.K., Wh.Tam, W.Yeo, L.K.Cheong.** 2001. High carriage rate of TT-Virus in the cervixes of pregnant women. *Clin Infect Dis*, 32:1376-1377
- 16 **Cheng J., T.Hada, W.D.Liu, H.Imanishi.** 2000. Investigation of TTV by in situ hybridization in patients with chronic hepatitis. *Hepatol Res*, 18:43-53
- 17 **Cheng J., T.Hada, K.Fukui, M.Ohno.**1999. Detection of TTV-DNA in serum of patients with chronic liver disease and interferon efficacy. *Hepatol Res.*, 14:97-104
- 18 **Christensen J.K., J.Eugen-Olsen, M.Sorensen, H.Ullum.** 2000. Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 181:1796-1799
- 19 **Chua P., V.R.Nerurka, Q.Yu, C.L.Woodward.** 2000. Lack of association between Kawasaki syndrom and infection with parvovirus B19, human herpesvirus 8, TT virus, GB virus, hepatitis C/G virus or Chlamidia pneumoniae. *Pediatr Infect Dis J*, 19:477-479
- 20 **Cleavinger P.J, D.H.Persing, H.Li, S.B.Moore.** 2000. Prevalence of TT-Virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers. *Am. J. Gastroenterol*, 95:772-776
- 21 **Danen-Van Oorschot A., D.F.Fisher, J.M.Grimbergen.** 1997. Apoptin induces apoptosis in human transformed and malignant cells but not in normal cells. *Proc.Natl. Acad Sci*, 94:5843-5847
- 22 **Davidson F., D.MacDonald, J.L.Mokili, L.E.Prescott.** 1999. Early acquisition of TT virus in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis*, 179:1070-1076

- 23     **Deng X., H.Terunuma, M.Sakamoto, M.Kitamura.** 2000. Higher prevalence and viral load of TT-Virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT-Virus. *J Med Virol*, 62(4):531-537
- 24     **Deutsch-Österreichische Empfehlungen zur HIV-Therapie in der Schwangerschaft.** Stand Mai 2003.
- 25     **Dhenain M., A.Bouletreau, F.Bourguignon, I.Poujol.** 2000. TT-Virus-review of the literature. *Clin Invest Med*, 23(6):307-317
- 26     **Desai S.M., A.S.Muerhoff, T.P.Leary, J.C.Erker.** 1999. Prevalence of TT virus infection in US blood donors and populations at risk for acquiring parenterally transmitted viruses. *J Infect Dis*, 179:1242-1244
- 27     **Erker J.C., T.P.Leary, S.M.Desai, I.K.Mushahwar.** 1999. Analysis of TT-Virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol*, 80,1743-1750
- 28     **Forns X., P.Hegerich, A.Darnell, S.U.Emerson.** 1999. High prevalence of TT-Virus infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J Med Virol*, 59:313-317
- 29     **Fukuda Y., I.Nakano, Y.Katano, T.Kumada.** 1999. TT-Virus is not associated with acute sporadic hepatitis. *Infection*, 27:125-128
- 30     **Gallian P., P.Biagini, S.Zhong, M.Touinssi.** 2000. TT-Virus a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1,2,3. *J Clin Virol*, 17:43-49
- 31     **Gallian P., Y.Berland, M.Olmer, D.Raccach.** 1999. TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J Clin Microbiol*, 37:2538-2542
- 32     **Gärtner.B, N.Müller-Lanzsch.** 2002. Herpesviren HHV-6/HHV-7. In: Doerr H.W. *Medizinische Virologie*. Erste Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag. S. 399
- 33     **Gerner P., R.Oettinger, W.Gerner, J.Falbrede.** 2000. Mother to infant transmission of TT-Virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J*, 19(11):1074-1077

- 34 **Gerner P.** 2000. TT virus infection in healthy children and in children with chronic hepatitis B or C. *J Pediatric*, 136(5):606-610
- 35 **Gilbert W., D.Dressler.** 1968. DNA replication: the rolling circle model. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 33:473-484
- 36 **Gimenez-Barcons M., X.Forns, S.Ampurdanes, M.Guilera.** 1999. Infection with a novel human DNA virus has no pathogenic significance in patients with liver diseases. *J Hepatol*, 30:1028-1034
- 37 **Griffith P.** 1999. Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev Med Virol*, 9:73-74
- 38 **Hallett R.L., J.P.Clewly, F.Bobet, P.J.McKiernan.** 2000. Characterization of a highly divergent TT-Virus genome. *J Gen Virol*, , 81,2273-2279
- 39 **Hamel A.L., L.Lin, P.Nayar.** 1998. Nucleotide sequence of porcine circovirus associated with postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs. *J Virol*, 72:5262-5267
- 40 **He C., F.Nomura, N.Yukimasa, S.Itoga.** 1999. Transfusion-transmitted virus infection in china: prevalence in blood donors and in patients with liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol*, 14:899-903
- 41 **He Z., Y.Zhou , H.Feng.** 1999. Cloning and sequencing of complete TT-Virus gene from Beijing region in China. unpublished
- 42 **Hijikata M., K.Takahashi, S.Mishiro.** 1999. Complete circular DNA genome of a TT-Virus variant ( isolate named SANBAN ) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology*, 260:17-22
- 43 **Hijikata M., K.Iwata, Y.Ohta, K.Nakao.** 1999. Genotypes of TT-Virus compared between liver disease patients and healthy individuals using a new PCR-system capable of differentiating 1a and 1b types from others. *Arch Virol*, 144:2345-2354
- 44 **Höhne M., E.Schreier.** 1999. TT-Virus Stand des Wissens. *Epidemiologisches Bulletin,RK-Institut*
- 45 **Inami T., N.Konomi, Y.Arakawa, K.Abe.** 2000. High prevalence of TT-Virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol*, 38(6): 2404-2408

- 46 **Iriyama M., H.Kimura, K.Nishizawa, K.Yoshioka.** 1999. The prevalence of TT virus infection and its relationship to hepatitis in children. *Med Microbiol Immunol*,188:83-89
- 47 **Irving W.L., J.K.Ball, S.Berridge, R.Curran.** 1999. TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence and sequence heterogeneity. *J Infect Dis*,180:27-34
- 48 **Iso K., Y.Suzuki, M.Takayama.** 2001. Mother to infant transmission of TT-Virus in Japan. *Int J Gynaecol Obstet* Oct;75(1):11-9
- 49 **Itoh K., M.Takahashi, M.Ukita, T.Nishizawa.** 1999. Influence of primers on the detection of TT-Virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 180:1750-1751
- 50 **Kanda Y., Y.Tanaka, M.Kami, T.Saito.** 1999. TT-virus in bone marrow transplant recipients. *Blood*, 93:2485-2490
- 51 **Kanda T., O.Yokosuka, T.Ikeuchi, T.Seta.** 1999. The role of TT-virus infection in acute viral hepatitis. *Hepatology*, 29:1905-1908
- 52 **Kao J.H., W.Chen, S.C.Hsiang, P.J.Chen.** 1999. Prevalence and implication of TT-virus infection: minimal role in patients with non-A-E hepatitis in Taiwan. *J Med Virol*, 59:307-312
- 53 **Kato A., M.Fujino, T.Nakamura, A.Ishihama.** 1995. Gene organization of Chicken Anemia Virus. *Virology*, 209:480-488
- 54 **Kato H., M.Mizokami, T.Nakano, Y.Kondo.** 1999. High prevalence and phylogenetic analysis of TT-virus infection in Mongolia. *Virus Res*, 60:171-179
- 55 **Kazi A., H.Miyata, K.Kurokawa, M.A.Khan.** 2000. High frequency of postnatal transmission of TT-Virus in infancy. *Arch Virol*, 145(3):535-540
- 56 **Khudyakov Y., M.E.Kong, B.Nichols, D.Reed.** 2000. Sequence heterogeneity of TT-Virus and closely related virus. *J Virol*, 74:2990-3000
- 57 **Kia T.**1999. In: Abdolvahab-Emminger H.(Hrsg.) Pädiatrie. Exaplan. Zweite Aufl. München: Urban&Fischer Verlag S. 1102-1103
- 58 **Leary T.P., J.C.Erker, M.L.Chalmas, S.M.Desai.** 1999. Improved detection systems for TT-Virus reveal high prevalence in human, nonhumans primates and farm animals. *J Gen Virol*, 80:2115-2120

- 59     **Lefrère J.J., F.Roudot-Thoraval, F.Lefrère, A.Kahfer.** 1999. Natural history of the TT-virus infection through follow-up of TTV-DNA positive multiple-transfused patients. *Blood*, 95:347-351
- 60     **Lippert.**1996. Beckeneingeweide. In: *Anatomie des Menschen*. Vierte Auflage. München. Urban&Schwarzenberg-Verlag.
- 61     **Lisitsyn N., N.Lisitsyn, M.Wigler.** 1993. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 259:946-951
- 62     **Lukert P.D., G.F.deBoer, J.L.Dale, P.Kesse.** 1995. Family circoviridae ,virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Sixth report fo the Intl. Committee on Taxonomy of viruses, Springer-Verlag
- 63     **MacDonald D.M., G.R.Scott, D.Clutterbuck, P.Simmonds.** 1999. Infrequent detection of TT-Virus infection in intravenous drug users, prostitutes and homosexual man. *J Infect Dis*, 179:686-689
- 64     **Maggi F., C.Fornai, M.L.Vatteroni, G.Siciliano.** 2001. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system Disorders. *J Med Virol* Oct;65(2):418-22
- 65     **Maggi F., C.Fornai, A.Morrica, F.Casula, M.L.Vatteroni.** 1999. High prevalence of TT-Virus viremia in italian patients, regardless of age, clinical diagnosis and previous interferon treatment. *J Infect Dis*, 180(3):838-842
- 66     **Maggi F., M.Pifferi, M.Bendinelli, S.Marchi.**2003. TT-Virus in the nasal Secretions of children with acute respiratory diseases: Relations to viremia and disease severity. *J Virology*,2418-2425
- 67     **Matsubara H., K.Michitaka, N.Horiike, T.Kihana.** 2001. Existence of TT-Virus DNA and TT-like mini Virus DNA in infant cord blood: mother to neonatal Transmission. *Hepatol Res*, 21(3):280-287
- 68     **Matsumoto H., A.Eyo, J.Shih, E.Tanaka.** 1999. Transfusion associated TT-virus infection and it's relationship to liver disease. *Hepatology*, 30:283-288
- 69     **Miyata H., H.Tsunoda, A.Kazi, A.Yamada.** 1999. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single- stranded DNA genome of TT-Virus, the first human circovirus. *J.Virol*, 73:3582-3586

- 70 **Morrica A., F.Maggi, M.L.Vatteroni, C.Fornai.** 2000. TT-Virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis*, 181(2):803-804
- 71 **Mulyanto M., M.Hijikata, M.Matsushita, G.Ingkokusmo.** 2000. TT-virus genotypes in native and non-native prostitutes of Irian Jaya, Indonesia: implication for non-occupational transmission. *Arch Virol*, 145:63-72
- 72 **Mushahwar I.K., J.C.Erker, A.S.Mürhoff, T.P.Leary.** 1999. Molecular and biophysical characterization of TT-Virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(6):3177-3182
- 73 **Nakano T., Y.M.Park, M.Mizokami, J.Y.Choi.** 1999. TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Nakano Korea. *J Hepatol*, 30:389-393
- 74 **Naoumov N.** 2000. TT-Virus highly prevalent, but still in search of a disease *J Hepatol*, 33:157-159
- 75 **Nishizawa T., H.Okamoto, K.Konishi, H.Yoshizawa.** 1997. A novel DNA virus ( TTV ) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun*, 241:92-97
- 76 **Nishizawa T., H.Okamoto, F.Tsuda, T.Aikawa.** 1999. Quasispecies of TT-virus with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol*, 73:9604-9608
- 77 **Oguchi T., E.Tanaka, K.Orii, M.Kobayashi.** 1999. Transmission of and liver injury by TT-virus in patients on maintenance hemodialysis. *J Gastroenterol*, 34:234-240
- 78 **Okamoto H., M.Takahashi, T.Nishizawa, M.Ukita.** 1999. Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT-Virus demonstrated by PCR with primers from coding and non-coding regions. *Virology*, 259:428-436
- 79 **Okamoto H., M.Takahashi, N.Kato, M.Fukuda.** Nov.2000. Sequestration of TT-Virus of restricted genotypes in peripheral blood Mononuclear cells. *J Virology*, 10236-10239
- 80 **Okamoto H., T.Nishizawa, M.Takahashi, S.Asabe.** 2001. Heterogeneous distribution of TT-Virus of distinct genotypes in multiple tissue from infected humans. *Virology*, 288(2):358-368



- 81 **Okamoto H., T.Nishizawa, M.Ukita, M.Takahashi.** 1999. The entire nucleotide sequence of a TT-Virus isolate from the United States (TUS01): comparison with reported isolates and phylogenetic analysis. *Virology*, 259:437-448
- 82 **Okamoto H., T.Nishizawa, N.Kato, M.Ukita.** 1998. Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus ( TTV ) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepato Res*, 10:1-16
- 83 **Okamoto H., T.Nishizawa, M.Takahashi, A.Tawara.** 2001. Genomic and evolutionary characterization of TT-Virus ( TTV ) in tupaia and comparison with species-specific TTV's in humans and non-human primates. *J General Virol*, 82:2041-2050
- 84 **Okamoto H., M. Fukuda, A.Tawara, T.Nishizawa.** 2000. Species-specific TT-Virus and cross species infection in nonhuman primates. *J Virol*, 74:1132-1139
- 85 **Okamoto H., T.Nishizawa, M.Ukita.** 1999. A novel unenveloped DNA virus associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *Intervirology*, 42:196-204
- 86 **Okamoto H., M.Ukita, T.Nishizawa, J.Kishimoto.** 2000. Circular double-stranded forms of TTV DNA in the liver. *J Virol*, 74:5161-5167
- 87 **Ott C., L.Duret, I.Chemin, C.Trepo.** 2000. Use of a TT-Virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TTV antibodies in human sera. *J Gen Virol*, 81:2949-2958
- 88 **Parquet M.C., M.Koga, H.Yatsushashi.** 1999. Prevalence and clinical characteristics of TT-Virus in patients with sporadic acute hepatitis of unknown etiology. *J Hepatol*, 31(6):985-989
- 89 **Pisani G., K.Cristiano, M.Wirz, G.Bisso.** 1999. Prevalence of TT-virus in plasma pools and blood products. *Br. J. Haematol*, 106:431-435
- 90 **Poovorawan Y., A.Theamboonlers, P. Jantaradsamee, N.Kaewin.** 1998. Hepatitis TT virus infection in high risk groups *Infection*, 26:335-358
- 91 **Prescott L.E., D.M.MacDonald, F.Davidson.** 1999. Sequence diversity of TT-Virus in geographically dispersed human populations. *J Gen Virol*, 80:1751-1758

- 92     **Prescott L.E., P.Simmonds.** 1998. Global distribution of transfusion transmitted virus. *N Engl J Med*, 339:767-777
- 93     **Romeo R., P.Hegerich, S.U.Emerson, M.Colombo.** 2000. High prevalence of TT-Virus in naïve chimpanzees and in Hepatitis C virus-infected humans: frequent mixed infections and identification of a new TTV genotypes in chimpanzees. *J Gen Virol*, 81:1001-1007
- 94     **Ross R.S., S.Viazov, V.Runde, U.W.Schäfer.** 1999. Detection of TT-Virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol*, 13(3):181-184
- 95     **Saback F.L., S.A.Gomes, V.S.De Paula, R.Da Silva.** 1999. Age-specific prevalence and transmission of TT-virus. *J Med Virol*, 59:318-322
- 96     **Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA.**1986. Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*;324(6093):163-6
- 97     **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.**1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci*; Dec;74(12):5463-7
- 98     **Schäfer.**2000. Maternofetale Transmission viraler Infektionen. *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Heft 5,2000
- 99     **Scholz M., J.U.Vogel, H.W.Doerr.**2002.HCMV-Infektion. In: Doerr H.W. *Medizinische Virologie*. Erste Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag. S.387
- 100    **Sears LE, Moran LS, Kissinger C, Creasey T, E, Slatko BE.**1992. Circum Vent thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable VentR (exo-) DNA polymerase. *Biotechniques*;13(4):626-33
- 101    **Simmonds P., F.Davidson, C.Lycett, L.E.Prescott.** 1998. Detection of a novel DNA virus in blood donors and blood products. *Lancet*, 352:191-195
- 102    **Slatko BE.**1996. Thermal cycle dideoxy DNA sequencing. *Mol Biotechnol.*; 6(3):311-22
- 103    **Springfeld C., J.J.Bugert, P.Schnitzler, E.Tobiasch.** 2000. TT-Virus as a human pathogen:significance and problems. *Virus Genes*, 20(1):35-45

- 104 **Sugiyama K., K.Goto, T.Ando, F.Mizutani.** 2001. Highly diverse TTV-population in infants and their mothers. *Virus Res*, 73(2):183-188
- 105 **Tagger A., F.Donato, M.L.Ribero, G.Binelli.** 1999. A case control study on a novel DNA virus ( TT virus ) infection and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 30:294-299
- 106 **Takahashi K., Y.Iwasa, M.Hijikata, S.Mishiro.** 2000. Identification of a new human DNA virus ( TTV-like minivirus, TLMV ) intermediately related to TT-virus and chicken anemia virus. *Arch Virol*, 145:979-993
- 107 **Takahashi K., Y.Ohta, S.Mishiro.** 1998. Partial 2.4 kb sequences of TT-Virus genome from 8 Japanese isolates: diagnostic and phylogenetic implications. *Hepatology Res*, 12:111-120
- 108 **Takahashi K., M.Hijikata, E.Samokhvalov.** 2000. Full or near full length nucleotide sequences of TT-Virus variants ( Types SANBAN and YONBAN ) and the TT-Virus-Like Mini Virus. *Intervirology*, 43:119-123
- 109 **Takahashi K., H.Hoshino, Y.Ohta, N.Yoshida.** 1998. Very high prevalence of TT virus infection in general population of Japan revealed by a new set of PCR primers. *Hepatology Res*, 12:233-239
- 110 **Takayama S., T.Miura, S.Matsuo, M.Taki.** 1999. Prevalence and persistence of a novel DNA TT-Virus infection in Japanese haemophiliacs. *Br J Haematol*, 104:626-629
- 111 **Tanaka M., S.Nishiguchi, T.Tanaka, M.Enomoto.** 1999. Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J Gastroenterol*, 34:589-593
- 112 **Tanaka Y., M.Mizokami, E.Orito, T.Nakano.** 1999. A new genotype of TT virus infection among Colombian native Indians. *J Med Virol*, 57:264-268
- 113 **Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ .** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22(22):4673-80
- 114 **Tischer I., L.Bode, J.Apodaca, H.Timm.** 1995. Presence of antibodies reacting with porcine circovirus in sera of humans, mice and cattle. *Arch Virol*, 140:1427-1439

- 115    **Tsuda F., H.Okamoto, M.Ukita, T.Tanaka.**1999. Determination of antibodies to TT-virus and application to blood donors and patients with post-transfusion non A-G hepatitis in Japan. *J Virol Methods*, 77:199-206
- 116    **Tuveri R., F.Jaffredo, F.Lunel, B.Nalpa.**2000. Impact of TT virus infection in acute and chronic, viral- and nonviral-related liver diseases. *J Hepatol*, 33:121-127
- 117    **Ukita M., H.Okamoto, N.Kato, Y.Miyakawa.**1999. Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus associated with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis*, 179:1245-1248
- 118    **Ukita M., H.Okamoto, T.Nishizawa, A.Tawara.**2000. The entire nucleotide sequences of two distinct TT-Virus isolates ( TJN01 and TJN02 ) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol*, 145,1543-1559
- 119    **Verschoor E.J., S.Langenhuijzen, J.L.Heeney.**1999. TT-virus of non-human primates and their relationship to the human TTV genotypes. *J Gen Virol*, 80:2491-2499
- 120    **Viazov S., R.Ross, C.Niel, J.M.Oliviera.**1998. Sequence variability in the putative coding region of TT-virus:evidence for two rather than several major types. *J Gen Virol*, 79:3085-3089
- 121    **Wolf.**2001. Schwangere HIV-infizierte Patientin. *Praxis*;90:1475-1476
- 122    **Wutzler P.** 2002. Varicella Zoster Virus. In: Doerr H.W. *Medizinische Virologie*. Erste Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag. S. 380
- 123    **Yuki N., M.Kato, M.Masuzawa, H.Ishida.**1999. Clinical implications of co-infection with a novel DNA-virus in hepatitis C virus carriers on maintenance.Hemodialysis. *J Med Virol*, 59:431-436

## **9. Anhang**

### **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. A. Stelzner, Prof. Dr. med. H.-J. Seewald, Frau Dr. R. Egerer, PD Dr. habil. R. Zell, PD Dr. habil. A. Henke, Dr. E. Birch-Hirschfeld, Prof. Dr. med. P. Wutzler,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeit erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Ronald Langner

**Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Axel Stelzner für die freundliche Überlassung des Themas und das Interesse an Fortgang und Abschluß der Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. Peter Wutzler als amtierenden Leiter des Institutes für Virologie und antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Großer Dank gebührt auch Herrn Prof. Dr. med. H-J. Seewald für die Organisation der Probenzusammenstellung und deren Bereitstellung für meine Untersuchungszwecke. In diesem Zusammenhang sollte die Bedeutung der Gewebebank der Frauenklinik der FSU Jena für diese Arbeit hervorgehoben werden, die durch die freundliche Überlassung der Proben durch Frau Dipl. Ing. S. Schröder erst ermöglicht wurde.

Für die stetige fachliche Unterstützung bedanke ich mich herzlich bei meiner Mentorin Frau Dr. Renate Egerer am Institut für Virologie und antivirale Chemotherapie der Friedrich-Schiller-Universität Jena.

Bei der Problematik der Sequenzierung und ihrer Durchführung sage ich Danke an Herrn PD Dr. Roland Zell für seine freundliche fachliche Beratung, an Herrn Dr. Eckardt Birch-Hirschfeld für die Synthese der Primer und an Frau MTA Sabine Wachsmuth für die praktischen Hilfen.

Die umfangreichen Laborarbeiten wären ohne die freundliche Kooperation mit Frau MTA Martina Müller, Frau CTA Geuther und Frau MTA Ohme nur schwer möglich gewesen, auch dafür mein Dank.

Für die moralische und motivierende Unterstützung durch Herrn PD Dr. Andreas Henke möchte ich mich besonders bedanken.

Ich möchte mich bei meiner Verlobten, Frau Daniela Ibrahim ganz herzlich für die Liebe und Motivation bedanken, die mir immer wieder Kraft gegeben hat.

Abschließend gilt mein Dank meinen Eltern, Reinhard und Kristina Langner, für Ihre permanente Hilfe und mentale Stärkung, ohne die ein Medizinstudium und die Anfertigung einer Dissertation nicht möglich gewesen wäre, daher widme ich Ihnen diese Arbeit.